



Exhibit B
to the Declaration of
Lawrence C. SMITH
(Progress Report)

Attorney Docket No. : 10662-86US MG/lyl

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANT : Lawrence C. SMITH EXAMINER: D. CROUCH
SERIAL NO. : 10/019,375 ART UNIT: 1632
FILED : March 5, 2002
FOR : TELOPHASE ENUCLEATED OOCYTES FOR NUCLEAR TRANSFER

* * * * *

DECLARATION OF Dr. Lawrence C. SMITH, Ph.D.

I, Lawrence C. SMITH hereby declare and say:

1. I am a citizen of Canada, presently residing at 2950, Lafontaine, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.
2. I am scientific researcher in the Animal Reproduction Research Centre of the "UNIVERSITÉ de MONTRÉAL", the owner of the above-identified patent.
3. That my academic background and experiences in the field of the present invention are listed on the enclosed *curriculum vitae*.
4. I am the inventor in the present application and have read and understand the specification.

SERIAL NO. : 10/019,375

5. That enclosed herewith is a copy of a French version of a grant application duly signed by Applicants and dated Novembre 28, 1997 along with an English translated version. This research progress report clearly shows, more specifically on pages 7 to 10, objectif 3 that the cloning method claimed in the present patent application was conceived before November 1998.

6. I am familiar with both English and French languages.

7. I have translated the French version of the progress report joined herewith into English and verily believe that it is a full translation into English of the original French text.

8. I declare further that all statements made on information and belief are believed to be true, and further that these statements were made with knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and such willful false statements may jeopardize the validity of the instant patent specification or any patent issuing thereon.

Date: June 3, 2005

By: 

TÉLÉCOPIE

DESTINATAIRE :

Monsieur Jean Noreau
Responsable de la gestion
du programme d'aide à la recherche

ADRESSE :

Conseil des recherches en pêche et en
agro-alimentaire du Québec (CORPAQ)

TÉLÉCOPIEUR :

(418-643-4079)

DATE :

12 décembre 1997

EXPÉDITEUR :

Céline Houle, agente d'administration

Téléphone : (514) 773-8521 poste 8437 OU 8201

Télécopieur : (514) 778-8105

NOMBRE TOTAL DE PAGES : 2

OBJECT : Projet # 4438

MESSAGE

Veuillez prendre note que lorsque nous vous avons envoyé le rapport de recherche du Dr Lawrence C. Smith, sur la feuille de signature nous avons omis d'indiquer l'adresse du Dr ElAzhary. Veuillez ajouter la feuille ci-jointe au dossier.

Merci.

**Conseil des recherches en pêche
et en agroalimentaire du Québec**

**DEMANDE POUR UN DEUXIÈME
RENOUVELLEMENT OU PLUS**

Ce formulaire doit être accompagné d'un rapport d'étape

**PROGRAMME DE RECHERCHE
ENTENTE AUXILIAIRE CANADA-QUÉBEC SUR LE DÉVELOPPEMENT AGROALIMENTAIRE
Demande de subvention pour l'année 1998-1999**

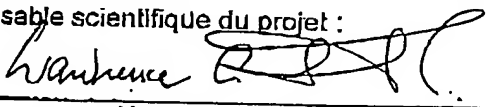
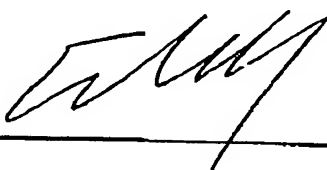
Toute demande originale doit être présentée avec une photocopie de tous les documents soumis.

No dossier (CORPAQ) : 4438	
Responsable :	Coreponsable (s'il y a lieu) :
Nom: Lawrence C. Smith	Nom:
Prénom: Lawrence C.	Prénom:
Adresse: C.R.R.A. / Médecine vétérinaire Université de Montréal 3200 rue Sicotte St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6	<u>Téléphone</u> Ind. rég. (514) 773-8521 Poste 8463 <u>Télécopieur</u> 778-8103

PROJET

Titre :	
Embryons bovins transgéniques produits par transfert de noyaux de	
lignées cellulaires embryonnaires transfectées	
Durée totale :	Durée résiduelle :

SIGNATURES

Je certifie que la recherche se déroule normalement et conformément au projet de recherche convenu. Je demande donc que la subvention de recherche soit renouvelée aux conditions déjà fixées.	
Les responsables :	
Responsable scientifique du projet :	Coreponsable scientifique du projet :
Signature:  Nom et adresse Youssef El-Azhary, DMV, MSc, Ph.D. Vice doyen à la recherche et au développement Université de Montréal, Fac. de Med. vet 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe J2S 7C6 Date: / 12-12-1997	Signature de son représentant ou de sa représentante 

PRÉVISIONS DE DÉPENSES

VOLET D'APPUI À LA RECHERCHE EN PARTENARIAT

Ce formulaire doit être accompagné de la description du projet ou du rapport d'étape

Demande de subvention pour l'année 1998-99

TOUTE DEMANDE ORIGINALE DOIT ÊTRE PRÉSENTÉE AVEC 1 PHOTOCOPIE COMPLÈTE

RESPONSABLE

RESPONSABLE		CORESponsable	
Nom: SMITH	Prénom: Lawrence C.	Nom:	Prénom:
TITRE DU PROJET			
Embryons bovins transgéniques produits par transfert de noyaux de lignées cellulaires embryonnaires transfectées			
			N° DU DOSSIER (CORPAQ) 4438

PRÉVISIONS DE DÉPENSES*

1. MEMBRES DE L'ÉQUIPE													MONTANTS PRÉVUS 1998-99	MONTANTS PRÉVUS 1999-2000	MONTANTS PRÉVUS POUR LA DURÉE TOTALE DU PROJET**	SOURCE DE FINANCEMENT**
NOMBRE	NOMS	PERSONNE-ANNÉE	CATÉGORIE													
			Chercheurs	Professionnels	3e cycle	2e cycle	1er cycle	Autre	Techniciens	De soutien	Quartiers	Autre				
	Etudiant au doctorat	1			X								8 000			A
	Etudiant à la maîtrise	1				X							5 000			A
	Technicien	.4							X				14 000			A
	Avantages sociaux (17%)												4 590			A
	Keefer, C.L. (*)	.45	X										9 750			O
	Karatzas, C.N. (*)	.05	X										3 750			O
	Lazanis, A. (*)	.05	X										---			O
	Zhou, J.-F. (*)	.07	X										2 380			O
	Poulin, S. & Gagnon, I. (*)	25							X				4 500			O
	SOUS-TOTAL (A)												31 590			A
	SOUS-TOTAL (O)												20 380			O
2. IMMOBILISATIONS (remplir la page 2 «IMMOBILISATIONS»)													\$	\$	\$	
SOUS-TOTAL (A)													---			A
SOUS-TOTAL (O)													---			O
3. FOURNITURES ET APPROVISIONNEMENTS — DESCRIPTION													\$	\$	\$	
Objectif 1													---			O
Objectif 2 - Milieux, sérums, anticorps, etc.													3 000			A
Objectif 3 - Milieux, ovaires, anticorps, etc.													8 200			A
Objectif 4 - Milieux, TE, dosage hormonal, etc.													5 000			O
SOUS-TOTAL (A)													11 200			A
SOUS-TOTAL (O)													5 000			O
4. AUTRES FRAIS — DESCRIPTION													\$	\$	\$	
Receveuses													18 250			O
Voyages à l'abattoir													2 000			A
Déplacements CRRA - Nexia													400			A
SOUS-TOTAL (A)													2 400			A
SOUS-TOTAL (O)													18 250			O
5. TOTAL DES PRÉVISIONS													\$	\$	\$	
SOUS-TOTAL (A)													45 190			
SOUS-TOTAL (O)													43 630			
TOTAL (A + O)													88 820			
(O / A + O) X 100***																
REVENUS, s'il y a lieu																

* Ne doivent être considérés que les coûts supplémentaires occasionnés par le projet. Toutefois, les salaires équivalant à la participation du personnel régulier de l'organisme privé doivent être indiqués si ils constituent une contribution de cet organisme dans la réalisation du projet.

** Pour chaque dépense, veuillez indiquer la source de financement: A=aide financière demandée dans le cadre du programme; O = contribution de l'organisme privé au projet.

*** Complétez la page 2 si projet de plus de 2 ans.

L. C. Smith - Projet #4438 - page 1/10

Rapport d'étape
Projet en deuxième renouvellement

1. Titre : Embryons bovins transgéniques produits par transfert de noyaux de lignées cellulaires embryonnaires transfectées

Les cellules souches embryonnaires (ES) sont utilisées de routine pour produire des souris transgéniques (Robertson, 1987). La technique utilisée chez la souris consiste à produire des chimères par injection de cellules ES dans un embryon hôte. L'animal chimérique qui en résulte possède des cellules dérivées de l'embryon hôte et des cellules transgéniques ES. En raison des différences entre le développement des souris et des animaux domestiques, la production de chimères dont les cellules germinales proviendraient de cellules souches embryonnaires (ES) n'a toujours pas été réalisée chez ces derniers sauf chez le porc. Dans ce cas, toutefois, les cellules ES n'avaient pas contribué à la formation des cellules germinales (Wheeler, 1994). Par ailleurs, des agneaux ont été produits par transfert nucléaire de lignées cellulaires provenant d'embryons et même d'adultes (Campbell et al. 1996; Wilmut et al. 1997). Puisque les rejetons ainsi produits proviennent d'une cellule donneuse unique, toutes les cellules, y compris les cellules germinales, sont génétiquement identiques et les problèmes associés aux chimères peuvent donc être évités. Le transfert nucléaire et les cellules souches embryonnaires seraient bien plus efficaces que les techniques de microinjection pronucléaire actuelles pour produire du bétail transgénique. En effet, contrairement à la microinjection directe d'ADN dans des zygotes au stade pronucléaire, la transfection de lignées cellulaires embryonnaires pourrait être réalisée *in vitro* par des techniques standards : procédés chimiques (lipides, phosphate de calcium), procédés physiques (électroporation, canon à gènes, injection directe) ou transfection rétrovirale. On pourrait sélectionner les cellules en vue d'une bonne intégration au génome et ainsi obtenir des lignées cellulaires dérivées dont le transgène intégré serait beaucoup plus stable. En outre, avec des techniques appropriées de sélection et de criblage des lignées cellulaires, la plupart des animaux transgéniques- et non moins de 10% comme avec la méthode actuelle- ainsi produits devraient exprimer le transgène de façon adéquate

Notre hypothèse de travail est que " les lignées cellulaires ES bovines transfectées peuvent être utilisées pour obtenir, par transfert nucléaire, des embryons transgéniques viables et des veaux ". Notre objectif général est donc la mise au point d'une méthode efficace de production des embryons et de rejetons transgéniques chez le bovin à l'aide de la technique de transfert nucléaire avec des lignées cellulaires embryonnaires transfectées.

2. L'état d'avancement des travaux

Nous avons accompli des progrès substantiels au regard de tous les objectifs proposés. Nous devrions donc atteindre notre objectif global à l'intérieur de l'échéancier initial.

Objectif 1 - Établir et transfecter des lignées cellulaires embryonnaires et caractériser les patrons d'expression

(i) Établissement de lignées cellulaires ES bovines.

Nos tentatives pour établir les lignées cellulaires ES bovines (BES) se sont d'abord heurtées à plusieurs obstacles, dont la difficulté de déterminer les couches nourricières appropriées et la composition des milieux de culture pour soutenir la croissance indifférenciée même après plusieurs passages. Notre technique actuelle consiste à utiliser des fibroblastes primaires dérivés d'embryons de souris prélevés à la mi-gestation dont le développement est stoppé à l'aide de la mitomycine. En réaction à un rapport non publié à ce jour à l'effet que des fibroblastes embryonnaires ovins transfectés

L. C. Smith - Projet #4438 - page 2/10

ont été utilisés avec succès par une compagnie pharmaceutique écossaise (PPL Inc.) pour produire un mouton transgénique, nous avons également établi des lignées cellulaires de fibroblastes embryonnaires bovins (BEF). La lignée BEF a été obtenue à partir d'un fœtus de 50 jours dont la peau a été coupée en petits morceaux à l'aide d'une lame, lavée dans un milieu ES puis mise en culture. La lignée cellulaire BEF en est actuellement à son 14^e passage et sera caractérisée sous peu.

Les lignées ES ont été obtenues à partir de blastocystes en expansion ou éclos produits dans des gouttes du milieu de B2 de Menezes, 8 jours après la fécondation *in vitro* (tableau 1). Après l'excision du trophectoderme, le bouton embryonnaire (ICM) a été placé dans une boîte de culture renfermant des couches nourricières de fibroblastes dans un milieu de culture ES-DMEM. Ce milieu est composé de DMEM à forte teneur en glucose (4,5 g/l), de 2 mM de L-glutamine (aucun pyruvate de sodium) et tamponné avec 2,2 g/l de bicarbonate de sodium (Gibco). On y ajoute un supplément d'acides aminés non essentiels MEM jusqu'à concurrence de 0,1 mM, de 0,1 mM de 2-mercaptoéthanol, de pénicilline (50 IU/ml), de streptomycine (50 IU/ml) et de 15% de SVF (sérum de veau fœtal) traités au charbon. Ce mélange est déposé sur des fibroblastes de souris bloqués à la mitomycine-C. Contrairement à ce qu'on retrouve chez la souris, il ne semble pas que le maintien au stade indifférencié des lignées ES bovines requiert la présence de LIF. Les boutons embryonnaires ont été aplatis puis fixés à la surface de la boîte à l'aide d'une lame de scalpel où ils ont pu poursuivre leur croissance comme lignées cellulaires pendant environ 14 jours. Les milieux de culture étaient changés aux 2 à 3 jours environ. Des colonies se sont formées après l'adhérence des cellules et les excroissances étaient soumises à des passages de manière mécanique (excision de petits amas) ou par trypsinisation (enzyme). Comme des passages fréquents par voie enzymatique entraînent souvent un fort pourcentage de lyse suivie d'une longue période de récupération et, occasionnellement, une différenciation des cellules, nous avons favorisé les passages mécaniques pour maintenir les lignées cellulaires souches embryonnaires bovines.

Tableau 1 - Comparaison des résultats obtenus par le passage enzymatique ou mécanique des lignées cellulaires ES sur des couches nourricières STO ou GEF.

Cellules ES	Couche nourricière	Mécanique		Trypsine	
		Propagation	Différenciation	Propagation	Différenciation
Bovine	STO	+++	+	++++	-
	GEF	+	++	++	++
Chèvre	STO	++	+	+++	-
	GEF	+	+++	++	+++
Propagation :		+ (certain degré d'adhérence et de croissance) → ++++ (croissance abondante)			
Différenciation :		- (colonies indifférenciées) → ++++ (différenciées)			

Plusieurs lignées ES bovines ont été mises en culture en novembre 1996, dont la plupart demeurent viables et conservent leurs caractéristiques morphologiques après 29 passages, soit, en moyenne, 1 passage au 13 jours (tableau 2). Un deuxième groupe de lignées ES a été mis en culture en août 1997 et est demeuré stable au cours des 5 passages suivants. Nous avons tenté de produire des lignées cellulaires ES à partir de blastocystes bovins récoltés *in vivo* 7 jours après l'oestrus. Bien que ces lignées aient semblé normales lors des premiers passages, toutes ont commencé à présenter des changements morphologiques indicatifs d'une différenciation au 4^e ou 5^e passage. Il semblerait donc que les blastocystes produits *in vivo* sont moins aptes à produire des lignées cellulaires ES capables de supporter de longues périodes de culture sous une forme indifférenciée. Ces périodes de culture semblent être un élément crucial dans l'établissement des lignées ES bovines *in vivo* comme *in vitro*.

puisque la plupart des lignées qui ont échoué ont commencé à présenter des signes d'arrêt de la division cellulaire et une différenciation morphologique après 4 ou 5 passages.

Tableau 2 - Lignées cellulaires BES établies à partir de boutons embryonnaires produits *in vitro* puis cultivées sur des monocouches de fibroblastes primaires d'embryons de souris.

	Caryotype	Sexe	2n	3n	4n
Lignée 1	60 XX	femelle	90%	10%	aucun
Lignée 2	60 XY	mâle	94%	aucun	6%
Lignée 3	60 XX	femelle	70%	10%	20%
Lignée 4	60 XX	femelle	70%	39%	aucun

Lors des premiers passages, on procède toujours à la congélation d'une partie des cellules souches d'embryons bovins afin de pouvoir les utiliser ultérieurement pour le rétablissement de la lignée dans l'éventualité d'une contamination accidentelle ou d'une différenciation ultérieure. Il faut donc recueillir des cellules ES en amas, les placer dans une solution de congélation DMEM à haute teneur en glucose, à 20% de SVF et à 10% de glycérol. Il n'y a pas eu d'inclusion de DMSO au moment de la congélation des cellules ES parce que ce produit induit une différenciation après le dégel des cellules. Les cellules ES sont demeurées à 4°C pendant 2 heures puis ont été placées dans des cryofioles pour être ensuite entreposées pendant 2 heures à -20°C. Enfin, après 24 heures à -70°C, les fioles ont été plongées dans l'azote liquide. Pour les décongeler, on place les fioles de cellules ES dans de l'eau à 37°C jusqu'à ce que le contenu de la fiole soit liquide puis on dépose ce contenu dans une boîte de Pétri de 60 mm renfermant des couches nourricières plongées dans le milieu ES-DMEM.

(ii) *Caractérisation des lignées embryonnaires*

Les lignées cellulaires ES bovines ou caprines établies dans nos laboratoires ont été caractérisées de plusieurs manières. Une première caractérisation a été effectuée par sélection des lignées qui présentent la morphologie des cellules de bouton embryonnaire. Après quelques passages *in vitro*, les lignées ES sélectionnées sont caractérisées par caryotypage afin de vérifier le nombre de chromosomes et déterminer le sexe chromosomique de la lignée (tableau 2). Nous avons dû modifier notre technique habituelle de caryotypage afin de l'adapter aux caractéristiques culturelles et morphologiques des lignées ES. Notre technique de caryotypage pour les lignées cellulaires ES bovines nécessitait l'étalement des cellules en boîte de Pétri sans fibroblastes primaires de souris mais avec du ES-DMEM conditionnés au fibroblastes de souris. Les cellules étaient traitées au 3^e jour pendant la phase de croissance logarithmique à l'aide de 0,4 µg/ml de nocodazole pendant 12 heures à 37°C afin de stopper la mitose chez les cellules. Après l'élimination du milieu de culture, les cellules sont trypsinisées, lavées puis placées dans une solution hypotonique de 0,8% de citrate de sodium pendant 1 heure afin de provoquer un gonflement des cellules et du noyau. Cette solution est éliminée et les cellules sont fixées pendant 1 heure dans une solution 3:1 méthanol-acide acétique glacial à 4°C. Le fixatif est éliminé et les cultures sont mises à sécher à la température de la pièce au cours de la nuit. Le jour suivant, les plaques sont colorées avec une solution Gimsa 5% pendant 5 à 10 minutes.

Une deuxième technique de caractérisation consiste à utiliser des marqueurs cellulaires comme la phosphatase alcaline, la cytokératine, la vimentine ou le SSEA1. Ces marqueurs peuvent être utilisés avec les lignées ES bovines ou caprines (Keefer et al. 1997). Bien que les lignées ES murines soient phosphatase alcalines positives, les lignées ES caprines présentent un mélange de cellules positives et négatives alors qu'elles sont toutes négatives dans les cultures ES bovines. La cytokératine étant associée aux cellules épithéliales, les cellules ES sont majoritairement négatives alors que la vimentine,

un marqueur de surface des fibroblastes (ex.: cellules STO) colorie faiblement certaines lignées ES. L'antigène embryonnaire spécifique de stade (SSEA1), un antigène des cellules ES murines, entraîne la coloration des lignées ES caprines; des essais seront effectués avec les lignées bovines.

(iii) *Transfection des lignées embryonnaires*

L'objectif de ce volet est d'optimiser les techniques de transfection pour les lignées cellulaires embryonnaires caprines et bovines potentielles (BES et GEF) afin, ultimement, d'obtenir des lignées stables qui seront utilisées dans le transfert nucléaire. Dans la première série d'expériences, nous avons utilisé le gène hybride nMTnLacZ fourni par le Dr Palmiter. Le plasmide renferme le gène rapporteur LacZ et un signal de localisation nucléaire sous la commande du promoteur nMT. L'avantage du LacZ nucléaire est qu'il permet de distinguer les faux positifs, c'est-à-dire ceux qui expriment le β -galactosidase endogène dans le cytoplasme, des cellules transfectées, qui expriment le gène de la β -galactosidase bactérienne. Dans des travaux plus récents, nous avons eu recours au gène hybride CMV/eGFP (plasmide pGREEN LANTERN-1, Life Technologies) et β -actine/eGFP. Ces gènes hybrides renferment le gène rapporteur Green Fluorescence Protein (GFP) de la méduse *Aequorea victoria*, qui code pour une protéine naturellement fluorescente et ne requiert donc aucun substrat de visualisation. Le GFP que nous utilisons a été "humanisé" (remplacement de la séquence du codon) et soumis à une mutation afin d'introduire la thréonine à la position 65 et ainsi accroître le pic de fluorescence. L'avantage d'utiliser ce gène de fluorescence comme gène rapporteur est qu'il produit une fluorescence verte très lumineuse lorsque les cellules vivantes ou fixées sont illuminées avec une lumière bleue et donc qu'il augmente la sensibilité de la technique de détection. Le plasmide renferme l'amplificateur/promoteur CMV en amont du gène GFP, le t-intron SV40 et le signal de polyadénylation. Un autre plasmide, l'actine/eGFP, a été produit. Ce plasmide a été obtenu par restriction du promoteur CMV du plasmide pGREEN LANTERN-1 et par son sous-clonage dans le promoteur B-actine fourni par le Dr G. Matleshewski.

Les cellules souches embryonnaires et les fibroblastes ont été transfectés comme suit : des amas de cellules provenant des lignées ont été déposés sur des cellules nourricières STO dans une plaque de 6 cupules et laissées en culture pendant 1 semaine de façon à leur permettre de former des colonies. Les cellules ont ensuite été transfectées à l'aide du CaPO₄ selon la procédure standard sauf pour un choc glycérique de 1 à 2 minutes en fin de l'incubation avec le précipité de CaPO₄. Les complexes lipides-ADN ont été obtenus par utilisation de la lipofectamine (Gibco/BRL) selon la méthode suggérée par le fournisseur. On retrouve au tableau 3 la quantité d'ADN utilisée (quantité absolue ou relative). Les complexes lipides-ADN produits à partir du DODAC/DOPE MLV's (INEX) ont été préparés ainsi : la quantité indiquée d'ADN a été diluée dans 0,2 ml de DMEM puis mêlée avec la quantité appropriée de MLV dans 0,2 ml de DMEM (c'est-à-dire, 2 nmoles de lipide par microgramme d'ADN pour un rapport de 1:6). Le mélange a été placé dans un vortex pendant 10 secondes puis laissé pendant 30 minutes à la température de la pièce afin de permettre la formation des complexes. Le volume a été porté 0,5 ml par l'ajout de DMEM et le mélange lipide-ADN a été versé sur les cellules qui ont ensuite été soumises à une période d'incubation de 16 à 20 heures à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Les cellules ont ensuite été placées dans du ES-DMEM et à nouveau mises en culture pendant 24 heures. Enfin, elles ont été fixées et colorées à l'aide des techniques habituelles afin de détecter les cellules qui exprimaient la β -galactosidase. Les transfections effectuées pour générer des lignées GEF stables sont essentiellement les mêmes que celles qui ont été décrites ci-dessus pour les lignées MLV. En résumé, les cellules ont été mises en boîte de Pétri à une concentration de 5×10^5 cellules par boîte

L. C. Smith - Projet #4438 - page 5/10

de 100 mm. Le jour suivant elles ont été lipofectées à l'aide du MLV dans un rapport de 2 à l'aide de 9 ug de l'ADN approprié et de 1 ug du plasmide sélectable (SV40/neo). Les cellules ont été mises en culture dans du DMEM à 10% de SVF pendant les premières 24 heures suivant la lipofection.

Tableau 3 - Transfections effectuées à l'aide du gène hybride mMTnLacZ dans des cellules souches embryonnaires bovines (BES) ou caprines (GES).

# expérience	Type cellulaire	Gène hybride	Transfection			% d'efficacité
			Méthode	Rapport	ADN (µg)	
1	BES	mMTnLacZ	MLV	1	1	0
				1	2	0
				2	1	0
				2	2	<1%
2	BES	mMTnLacZ	lipofectamine	1:3	1	0
3	BES	mMTnLacZ	MLV en suspension	1:5	1	0
				1	1	cellules n'ont pas survécues
4	GES	mMTnLacZ	CaPO ₄ MLV	1	2	"
				n.a.	2.5 /puits	0
					1	0
5	GES	mMTnLacZ	MLV		2	<1%
				1	2	0
					4	0
				2	2	1-2 bleu
					4	<1%

Subséquentement, elles ont reçu aux 2 jours un supplément de DMEM + 10% de SVF renfermant 500 ug/ml de G418. Des colonies résistantes ont été isolées après 4 jours de sélection. Les clones résiduels ont été rassemblés et mis en culture de masse (pools). L'expression du GFP a été confirmée par visualisation des cellules vivantes à l'aide de lumière bleue.

Objectif 2 - Mise au point des protocoles de synchronisation du cycle cellulaire

Nos efforts pour synchroniser les lignées cellulaires bovines ES ont porté principalement sur l'utilisation de la privation de sérum. Il s'agissait d'utiliser 0,5% de SVF dans du ES-DMEM puis de mettre en culture des lignées pendant plusieurs jours. Après des périodes variables d'exposition à des faibles concentrations de SVF, les lignées étaient remises dans un milieu à 20% afin de déterminer leur capacité des lignées ES à poursuivre leur croissance sans se différencier. Nous avons observé que, dans plusieurs cas, les cellules supportent la privation de sérum pendant une période allant jusqu'à 7 jours sans perdre leur capacité à reprendre la division cellulaire et à poursuivre leur croissance de cellules indifférenciées. Cependant, une privation de plus de 7 jours tend à se traduire par une récupération plus lente des lignées et la mort de plusieurs d'entre elles. D'autres lignées ES bovines privées pendant plusieurs jours se différencient en lignées fibroblastiques qui arrêtent de se diviser après quelques passages seulement.

(i) Index mitotique à la suite de la privation de sérum

L'objectif de ces travaux était de déterminer si la privation de sérum réduisait le pourcentage de cellules ES qui entrent en mitose après différentes périodes de culture dans 0,5% de sérum de veau foetal (tableau 4). Les résultats indiquent une légère diminution de l'activité mitotique dans les 24 heures suivant la privation de sérum. Cependant, l'activité mitotique demeure largement la même à partir de ce moment et pendant les 4 jours suivants la culture avec de faibles concentrations de SVF. Une étude parallèle au cours de laquelle aucun SVF n'était ajouté au milieu de culture a permis d'observer qu'aucune diminution ultérieure de l'activité mitotique ne survenait. Ces cellules seraient donc capables de s'adapter aux conditions de culture en doublant la longueur de leur cycle cellulaire.

(ii) Patrons de synthèse protéinique chez les lignées ES bovines privées de sérum

L. C. Smith - Projet #4438 - page 6/10

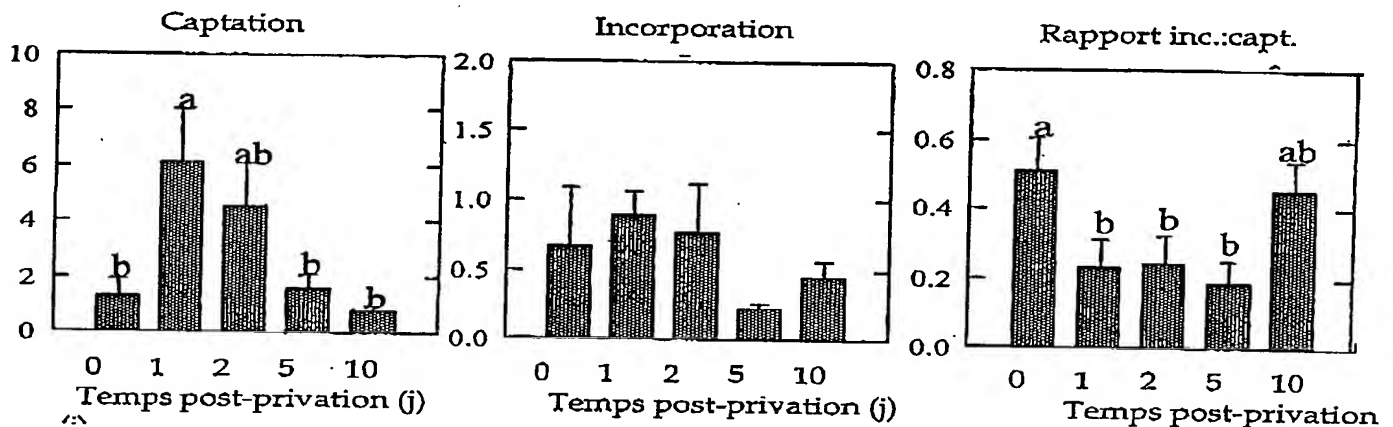
Nous avons caractérisé l'activité de synthèse protéinique chez les lignées ES bovines exposées à de faibles concentrations de sérum. Les cellules ont été placées dans les milieux de culture renfermant 0,5% de SVF puis récoltées à des moments précis afin d'examiner leur capacité à capter puis à incorporer la méthionine radiomarquée dans les protéines. Les cellules récoltées ont été incubées pendant 2 heures dans un milieu renfermant de la L-[³⁵S]-méthionine (1 mCi/ml, >800 Ci mmol;

Tableau 4 - Effets de la privation de sérum sur l'activité mitotique des lignées cellulaires ES bovines pendant les 5 jours de culture ultérieure.

	Pourcentage de noyaux en mitose après privation de sérum (0,5% SVF)					
	Témoins	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
Lignée 1	3,0%	1,5%	3,5%	1,0%	2,0%	1,0%
Lignée 2	2,0%	2,5%	0,5%	1,0%	1,0%	Aucun
Lignée 3	5,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,5%	2,0%
Moyenne	3,3%	1,5%	1,7%	1,2%	1,8%	1,0%

Amersham, Canada). Les résultats indiquent que la captation de méthionine était significativement accrue par la privation de sérum dans les premières 24 heures de culture (figure 1). Néanmoins, il semble que les cellules puissent se remettre du choc initial et revenir aux niveaux habituels de captation de méthionine après 5 jours de culture à 0,5% de SVF et les maintenir constants pendant au moins 10 jours de privation de sérum. La synthèse de nouvelles protéines n'a pas varié de façon significative pendant la période analysée ($P \geq 0,05$). Cependant, nous avons observé une diminution du rapport captation:incorporation après 24 heures de culture à 0,5% de SVF, ce qui indiquerait une chute de la capacité des cellules privées de sérum à synthétiser des protéines à partir d'un capital accru de précurseur des acides aminés. Quoiqu'il en soit, le rapport incorporation:captation a été stabilisé après 10 jours de privation : les cellules seraient donc en mesure de s'adapter à de faibles niveaux de SVF dans leur milieu de culture.

Figure 1 - Effets de la privation de sérum (0,5% SVF) sur la capacité des cellules de type ES bovines à capter puis à synthétiser des protéines.



(iii) Stade du cycle cellulaire chez les cellules ES bovines privées de sérum

La cytométrie en flux est utilisée de routine pour vérifier à quel stade du cycle cellulaire se trouvent les lignées cellulaires somatiques. Il faut d'abord trypsiniser les cultures afin d'obtenir une population de cellules individuelles, qui sont ensuite colorées à l'aide d'iodure de propidium, un colorant spécifique de l'ADN afin de quantifier l'ADN dans chaque cellule. Il est cependant extrêmement important d'obtenir au préalable une suspension de cellules exempte de tout amas. Les

L. C. Smith - Projet #4438 - page 7/10

cellules ES bovines adhèrent fortement sous forme de colonies compactes au support physique ce qui compliqué la désagrégation des cellules viables.. La méthode qui a permis les meilleures lectures par cytométrie de flux est la trypsinisation suivie d'un pipettage fin et d'un passage des cellules dans un filtre de nylon à maillage de 40 µm. Les cellules doivent ensuite être fixées dans 70% d'éthanol dans un milieu PBS puis perméabilisées à l'aide d'une solution à 0,5% de triton pendant 1 heure à 4°C. Bien que le nombre de lignées étudiées soit trop faible pour pouvoir tirer des conclusions, les résultats préliminaires semblent indiquer que les cellules ES bovines ne réagissent pas à la privation de sérum pendant les premiers 24 heures de culture à 0,5% de SVF. Au cours du deuxième jour de privation, certaines lignées demeurent inchangées alors que d'autres semblent répondre en se transformant en une population de cellules G2 plus représentatives d'une lignée proliférative. D'autres lignées devront être soumises à des plus longues périodes de privation de sérum afin de déterminer si la synchronisation en G0 peut être obtenue après plusieurs jours de culture avec de faibles niveaux de SVF. La synchronisation du cycle cellulaire a également été accomplie chez une lignée de fibroblastes embryonnaires bovins. Comme il est beaucoup plus facile de séparer ces fibroblastes avec la trypsine, ces populations de cellules isolées se prêtent beaucoup mieux à la cytométrie en flux que les lignées ES. Cette lignée cellulaire de fibroblastes bovins a permis d'obtenir plus de 95% de cellules en G0/G1 dans les premiers 24 heures de culture. En outre, aucun changement dans la synchronisation du cycle cellulaire n'a été observé tout au long de la période de privation de sérum de 10 jours.

(iv) *Composition de l'histone H1 dans les cellules ES bovines privées de sérum*

Le dernier aspect lié à la privation de sérum qui devait être étudié était le degré de modification de la composition de la chromatine par immunocytochimie au regard de différentes formes d'histone H1, un histone de liaison responsable de la forme solénoïdale de l'ADN nucléaire. L'existence d'une corrélation entre l'histone H1 et l'activité de transcription de la chromatine a été démontrée chez plusieurs animaux, y compris chez le bovin (Smith et al, 1996). Une autre forme d'histone H1, la H1° se retrouve chez les cellules en différenciation terminale et serait également la forme embryonnaire de l'histone H1. Notre objectif ici était d'étudier la composition de l'histone H1 somatique dans les noyaux des cellules ES bovines exposées à de faibles concentrations de SVF. De plus, afin de vérifier si la privation de sérum pouvait induire l'assemblage de l'H1° sur la chromatine, des lignées ES bovines ont été placées dans un milieu à 0,5% de SVF pendant 10 jours et des échantillons ont été prélevés à différents moments puis examinés par immunohistochimie pour détecter la présence de l'H1 somatique et l'H1°. Ces études ont été réalisées en collaboration avec le Dr Hugh Clarke du Département d'obstétrique et de gynécologie de l'Université McGill. Avec l'anticorps anti-H1 somatique, nous avons pu observer une forte coloration du début à la fin (10e jour) de la période de privation (0,5% SVF). Cependant, alors que l'H1° était absent du noyau des cellules privées de sérum au cours des 5 premiers jours de culture dans un milieu à faible teneur en SVF, dès le 6e jour, il a commencé à se manifester dans les noyaux. Les cellules privées de sérum subiraient donc des modifications du complément d'histone de leur chromatine similaires à celles qui sont observées chez les cellules en différenciation terminale. Ces modifications sont peut être nécessaires à une bonne reprogrammation, c'est-à-dire à un retour à la totipotence des noyaux des donneurs différenciés.

Objectif 3 - Mise au point des protocoles de transfert de noyaux provenant de cellules synchronisées

Notre objectif ici était de raffiner les techniques de reconstitution des ovocytes bovins à partir de cellules ES et de donneurs de noyaux. La première embûche a été d'arriver à récolter des cellules donneuses ES individuelles sans causer de dommage important à la membrane, ce qui aurait affecté la

fusion aux ovocytes receveurs. En ce moment, nous utilisons de faibles quantités de trypsine et de sérum de poulet parce que cela permet une désagrégation suffisante. Les cellules sont ensuite "pipettées" en présence d'un milieu renfermant de la cytochalasine. Plusieurs cellules sont détruites au cours de ce processus, mais le nombre de cellules morphologiquement viables demeure suffisant.

(i) *Mise au point d'un protocole de transfert nucléaire (TN) à l'aide d'ovocytes activés*

La technique de transfert de noyaux dans des ovocytes en métaphase a été largement perfectionnée lors d'études antérieures. Cependant, le principal facteur qui influence les interactions nucléo-cytoplasmiques suivant la fusion est le contraste entre les niveaux de MPF élevés dans le cytoplasme et faibles chez la cellule donneuse de noyaux, qui se trouve en interphase. Ceci favorise une condensation prématurée des chromosomes (CPC) de la chromatine du donneur et, dans certains cas, leur pulvérisation. Pour l'éviter, les ovocytes receveurs peuvent être activés artificiellement entre l'énucléation et la fusion. Cependant, plusieurs ovocytes ne répondent pas au stimulus d'activation et on observe alors une baisse des niveaux de MPF, qui reviennent toutefois à leur niveau préactivation peu de temps après. De plus, les ovocytes manipulés doivent être colorés avec un colorant spécifique de l'ADN puis exposés aux UV afin de s'assurer que l'énucléation a été réussie. Nous avons mis au point une nouvelle technique d'énucléation des ovocytes (énucléation en télophase) : elle consiste à activer les ovocytes puis à attendre jusqu'à l'extrusion du deuxième corps polaire avant de procéder à l'énucléation (Bordignon et Smith, 1997). Le fait que la plaque télophasique se positionne par rapport au deuxième corps polaire permet d'énucléer de manière précise sans l'aide de colorant de l'ADN ou d'irradiation aux UV, qui sont réputés néfastes pour le développement des embryons. Les pourcentages d'énucléation sont élevés lorsque cette technique est effectuée 3 h (97%), 4 h (98%) ou 5 h (92%) après l'activation à l'éthanol. Ils diminuaient de manière significative avec la technique d'énucléation en métaphase (59%), qui suppose l'élimination d'environ 30% du cytoplasme autour du premier corps polaire. Des études réalisées avec des blastomères de morula à J5 ont démontré que la technique en télophase était nettement supérieure à la technique en métaphase dans la cas des ovocytes secondaires âgés et refroidis.

Tableau 5 - Développement *in vitro* d'embryons reconstitués à l'aide de cytoplasmes receveurs et de la technique d'énucléation en télophase II.

Groupe expérimental	n (ovocytes)	n (groupes de réplication)	Fusion (%)	Blastocyste (%)	n (noyaux par blastocyste) (SE)
Télophase II	215	6	129 (58,1)	49 (38,0) ^a	126,2 (10,49) ^c
Métaphase II	248	6	151 (59,7)	24 (16,0) ^b	83,7 (8,69) ^d

Les résultats associés à un exposant différent, diffèrent de manière significative (a,b $P < 0,001$; c,d $P < 0,02$)

(ii) *Transfert nucléaire à l'aide de cellules ES bovines*

Ces résultats nous ont permis d'entreprendre des études avec des cellules donneuses provenant de notre lignée ES bovine. Ces cellules ES ont été désagrégées à l'aide de la technique décrite plus tôt puis placées dans l'espace périvitellin d'ovocytes énucléés et enfin exposées à un courant électrique, qui a provoqué la fusion entre la membrane du donneur et celle des cellules receveuses. Les paramètres électriques ont dû être ajustés parce que les cellules ES sont plus facilement lysées par le passage d'un courant électrique. Nous avons utilisé des courants doubles de 100 μ sec à 1,5 Kvolts/cm, qui sont significativement plus efficaces qu'un courant unique d'intensité et de durée similaires. La stimulation électrique doit être appliquée aussitôt que possible après l'insertion de la cellule donneuse de noyaux dans l'espace périvitellin si on veut obtenir une bonne fusion. Néanmoins, l'efficacité de cette fusion est substantiellement plus faible chez les cellules ES que chez les blastomères (tableau 6). Nous

L. C. Smith - Projet #4438 - page 9/10

tentons maintenant d'obtenir des solutions virales inactivées qui possèdent des affinités de fusion avec les cellules bovines. De la phytohémagglutinine a été ajoutée afin d'obtenir une meilleure apposition des cellules donneuses de noyaux aux ooplastes énucléés au moment du passage du courant électrique ou de l'exposition à la solution virale. Après la fusion, les embryons sont cultivés pendant 7 jours en présence du milieu de culture B2 de Menezo, auquel on ajoute un supplément de 10% de sérum de veau foetal.

Tableau 6 - Fusion et développement chez des embryons bovins reconstitués à partir de noyaux provenant de cellules ES bovines exposées (privées) ou non (témoins) à de faibles concentrations de SVF.

	Métaphase II		Télophase II	
	Témoins	Privées	Témoins	Privées
n(reconstitutions)	33	42	38	38
n(fusions)	12	13	11	13
(%)	(36%)	(31%)	(30%)	(34%)
n(divisions)	2	4	5	3
(%)	(17%)	(31%)	(45%)	(23%)
n(blastocystes)	1	1	3	2
(%)	(8%)	(8%)	(27%)	(15%)

(iii) *Établissement de système de culture exempt de sérum*

Un de nos objectifs initiaux était d'établir un milieu de culture défini exempt de sérum. Les autres objectifs étaient (1) de voir si un faible niveau atmosphérique d'oxygène améliorerait les compétences ontogéniques en l'absence de sérum et (2) si les cellules épithéliales de l'oviducte bovin (CEOB) étaient nécessaires pour obtenir un fort taux de blastocyste. Trois types de milieux de culture ont été utilisés dans cette étude. En résumé, pour une teneur en oxygène de 20%, le milieu B2 de Menezo peut être utilisé sans sérum sans aucun impact sur le taux de blastocyste (tableau 7). Le TCM-199 additionné de 30 mg/ml constitue également un milieu de culture approprié pour la production de blastocystes (37%) même en l'absence de sérum. Dans les deux cas présentés ci-dessus, l'ajout de CEOB est un facteur crucial pour l'obtention d'un taux de blastocyste optimal. Par contre, à 5% d'oxygène, la présence de CEOB n'a pas permis d'obtenir un bon taux de blastocyste.

Tableau 7 - Effet de l'ajout d'un supplément de sérum pendant la culture sur la production de blastocystes bovins *in vitro*

Sérum		20 % d'oxygène		5% d'oxygène	
		CEOB	sans CEOB	CEOB	sans CEOB
OUI	Blastocystes (nuclei)	45% (119)	21% (42)	7% (85)	26% (113)
NON	% Blastocystes (nuclei)	47% (155)	17% (23)	8% (81)	28% (118)

Objectif 4 - Caractériser les embryons produits par transfert des noyaux

Ce dernier volet de l'étude sera principalement réalisé au cours de la troisième année du projet. Néanmoins, comme nous le décrivons ci-dessous, la réalisation de plusieurs éléments est déjà amorcée.

(i) *Utilisation des lignées cellulaires transfectées pour le TN*

Comme les cellules fibroblastiques embryonnaires de chèvre (FEC) se prêtaient mieux à la transfection, elles ont été transfectées avec la protéine de fluorescence verte (PFV) lors d'essais préliminaires de transfert nucléaire. Les cytoplasmes receveurs provenaient d'ovocytes bovins mûris *in vitro* puis énucléés et les cellules donneuses étaient des cellules FEC-PFV. Comme on peut le voir au tableau 8 ci-dessous, certains jeunes embryons qui exprimaient la PFV ont été obtenus. Lorsque nous avons utilisé la lignée clonale de cellules FEC-PFV, toutes les cellules exprimaient la PFV. Les

cellules donneuses non fusionnées ont pu être facilement identifiées parce que contrairement au cytoplasme receveur, elles émettaient une radiation fluorescente. Les embryons FEC positifs produits par microinjection pronucléaire présentent fréquemment une expression en mosaïque (cellules positives et négatives dans le même embryon) et une disparition de l'expression de la PFV lors du développement ultérieur. Des études en cours permettront de déterminer si les embryons PFV positifs produits par transfert nucléaire présentent des patrons d'expression de la PFV similaires.

Tableau 8 - Potentiel ontogénique et caractérisation des ovocytes bovins reconstitués à partir de noyaux dérivés de lignées de fibroblastes embryonnaires de chèvre transfectés

Donneur x cellules receveuses	n(embryons reconstitués)	n(embryons de 2-8 blastomères)	n(embryons > 8 blastomères)	n(embryons exprimant la PFV)
FEC-PFV x cyt. receveurs bovins	42	30	2	9
				(21%)

3. Commentaires

Ces résultats démontrent clairement que la plupart des objectifs du premier volet du projet ont été atteints. Nous sommes maintenant prêts à transfecter la lignée de fibroblastes bovins, ce qui devrait être suffisant pour permettre la production d'embryons bovins transgéniques. Entre-temps, les fibroblastes d'embryons bovins continueront de servir dans les études de transfection. Ils seront, par ailleurs, utilisés pour le transfert nucléaire dès l'obtention de la lignée transgénique. Les embryons transgéniques reconstitués seront caractérisés au regard de la présence du transgène puis transférés dans des receveuses synchronisées. Il sera alors possible de recueillir des informations sur la viabilité post-implantation et le potentiel de développement à terme.

- Bordignon, V. and L.C. Smith, 1997 Telophase enucleation: An improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol. Reprod. Develop.* (sous presse)
- Campbell, K.H.S., J. McWhir, W.A. Ritchie and I. Wilmut, 1996 Sheep cloned by nuclear transfer from cultured cell line. *Nature* 380: 64-66.
- Keefer, C.L., C.N. Karatzas, A. Lazaris-Karatzas, I. Gagnon, S. Poulin, B. Downey (1996) Isolation and maintenance of putative embryonic cells derived from Nigerian Dwarf goat embryos. *Biol. Reprod.* 54: abst. 462.
- Robertson, E.J., 1987 Embryo-derived stem cell lines, pp. 71-112 *Teratocarcinomas and embryonic Stem cells: a practical approach*, edited by E. J. Robertson. IRL Press, Oxford.
- Wheeler, M.B., 1994 Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 563-568.
- Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind and K.H.S. Campbell, 1997 Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.

LES SIGNATURES

Dr Lawrence Smith

Dr. Anthoula Lazaris

Dr Carol L Keefer

Dr Jiang-Feng Zhou

Dr Costas Karatzas



Documents for attorney's convenience

**CONSEIL DES RECHERCHES EN PÊCHE
ET EN AGRO-ALIMENTAIRE DU QUÉBEC**
**PROPOSITION POUR UN NOUVEAU PROJET
VOLET D'APPUI À LA RECHERCHE
EN PARTENARIAT**

000268

4438

Aucune annexe ne sera considérée

PROGRAMME DE RECHERCHE
**ENTENTE AUXILIAIRE CANADA - QUÉBEC SUR LE DÉVELOPPEMENT AGROALIMENTAIRE
DEMANDE DE SUBVENTION POUR L'ANNÉE 1996-1997***

FEV

Toute demande originale doit être présentée avec une photocopie de ce document

DESCRIPTION DU PROJET

1. TITRE Embryons bovins transgéniques produits par transfert de noyaux de lignées cellulaires embryonnaires transfectées		
2. NUMÉRO DES ORIENTATIONS DE RECHERCHE VISÉES (selon le document du CORPAQ) 1, 2	DURÉE TOTALE DU PROJET 3 an(s)	AIDE GOUVERNEMENTALE DEMANDÉE (estimation) 150 .K \$
PRODUIT/RESSOURCE (codes)* 114	FONCTION/DISCIPLINE (codes)* 01-02	CONTRIBUTION DE L'ORGANISME PRIVÉ 100 .K \$
3. BUT VISÉ		

Notre principal objectif est de mettre au point une méthode pour produire des bovins transgéniques par transfert, dans des oocytes bovins énucléés, de noyaux recueillis dans des lignées cellulaires embryonnaires transfectées. Les sous-objectifs sont : 1) la mise au point d'une construction génique permettant la caractérisation de l'expression du transgène au stade de blastocyste, 2) la mise au point de méthodes de synchronisation du cycle cellulaire de lignées embryonnaires établies, 3) la détermination des capacités de développement de noyaux synchronisés par transfert nucléaire, 4) la caractérisation de la transfection dans des embryons en développement ou dans des lignées cellulaires dérivées de ces embryons et 5) le transfert de blastocystes transfectés dans des receveuses afin d'évaluer leur capacité à poursuivre leur développement à terme.

4. APERÇU DU PROJET

Le projet sera réalisé dans les installations du CRRA et de Nexia par le personnel de ces deux institutions. Au cours de la phase A, nous utiliserons les compétences en biologie moléculaire de Nexia afin de : (i) mettre au point une construction génique et (ii) transférer des lignées cellulaires embryonnaires bovines puis de caractériser les patrons d'expression. À la Phase B, nous utiliserons les compétences du CRRA pour : (i) mettre au point des protocoles de synchronisation du cycle cellulaire de lignées cellulaires embryonnaires transfectées ou témoins et (ii) pour transférer des noyaux provenant de cellules synchronisées afin d'évaluer leur capacité à soutenir le développement *in vitro* du zygote jusqu'au stade blastocyste. Finalement, à la phase C, les embryons seront caractérisés au regard de la présence du gène transfecté et certains seront transférés dans des vaches receveuses afin d'évaluer leur capacité à poursuivre leur développement à terme. Cette dernière phase sera réalisée au CRRA et chez Nexia. Les phases A et B seront effectuées simultanément pendant les deux premières années et la phase C, au cours de la troisième année du projet.

PERTINENCE DU PROJET
5. IMPACT DU BUT VISÉ SUR LA FILIÈRE, LA RESSOURCE ET SUR LE BIOALIMENTAIRE

La production laitière est le volet le plus important de l'agro-alimentaire québécois. Les ententes de l'ALENA et du GATT auront comme conséquence un accroissement considérable de la concurrence internationale sur le marché intérieur. Il est cependant possible de nous y maintenir et même d'élargir nos marchés d'exportation si nous devenons plus concurrentiel au regard des prix, des caractéristiques des produits et des modes de production. L'efficacité en production laitière est le fruit d'une sélection génétique rigoureuse des bovins laitiers combinée à des pratiques de gestion modernes et raffinées. Ce projet porte sur une technologie génétique qui, en améliorant sa composition, confèrera au lait une valeur ajoutée. On pense ici à l'amélioration de la valeur nutritive du lait et de ses

Seulement les responsables scientifiques présentant les propositions les plus pertinentes seront invités à présenter une proposition détaillée.

* Rétour à la brochure explicative du Programme.

**CONSEIL DES RECHERCHES EN PÊCHE
ET EN AGRO-ALIMENTAIRE DU QUÉBEC**
**PROPOSITION POUR UN NOUVEAU PROJET
VOLET D'APPUI À LA RECHERCHE
EN PARTENARIAT**

Aucune annexe ne sera considérée

4438

PROGRAMME DE RECHERCHE
**ENTENTE AUXILIAIRE CANADA - QUÉBEC SUR LE DÉVELOPPEMENT AGROALIMENTAIRE
DEMANDE DE SUBVENTION POUR L'ANNÉE 1996-1997**

Toute demande originale doit être présentée avec une photocopie de ce document

TITRE	Embryons bovins transgéniques produits par transfert de noyaux de lignées cellulaires embryonnaires transfectées
--------------	--

PERTINENCE DU PROJET (suite)
5. IMPACT DU BUT VISÉ SUR LA FILIÈRE, LA RESSOURCE ET SUR LE BIOALIMENTAIRE (suite)

caractéristiques de transformation. Ainsi, l'augmentation de la concentration des protéines du lait permettrait d'augmenter non seulement la valeur nutritionnelle de ce dernier, mais aussi la quantité de fromage qu'on en tire. Le producteur serait également gagnant puisqu'avec la structure actuelle d'établissement des prix, qui varient selon les composantes, il est avantageux d'augmenter le contenu en protéines. Le transformateur y trouvera aussi son compte puisque la quantité de fromage obtenue augmentera sans qu'il ait à sacrifier la qualité du produit.

6. PERTINENCE DU PROJET EN REGARD DES ORIENTATIONS DU CORPAQ ET DES OBJECTIFS DU VOLET

Tout le projet porte sur des améliorations techniques dans le domaine de la génétique des bovins laitiers. Il devrait donc permettre à l'industrie québécoise de concurrencer de façon plus efficace les autres pays producteurs. Ce projet comporte un élément de valeur ajoutée puisqu'il va permettre d'améliorer la composition du lait grâce à des manipulations génétiques, d'augmenter l'efficacité des procédés de transformation du lait et de favoriser l'émergence de nouveaux produits dérivés. Le Québec deviendra donc plus concurrentiel sur le marché laitier nord-américain. Cette utilisation judicieuse de l'amélioration génétique en vue de modifier la composition du lait et des technologies de reproduction d'avant-garde (transfert nucléaire, etc.) permettra à l'industrie laitière québécoise d'obtenir une valeur ajoutée à son lait. Le fait que ce projet associe des biologistes en reproduction du bétail laitier à des biologistes moléculaires constitue un avantage unique : ensemble, ces chercheurs seront en mesure de faire concurrence aux chercheurs industriels des autres pays producteurs.

7. EFFORT SUPPLÉMENTAIRE EN RECHERCHE DES ORGANISMES PRIVÉS ET ACCUEIL TECHNOLOGIQUE

Nexia Biotechnologies comprend une équipe de six chercheurs à temps plein qui travaillent à mettre au point des méthodes de pointe en vue de produire des chèvres transgéniques. Le Dr Carol Keefer, une experte de réputation internationale en embryologie bovine, dirige cette équipe dans un but précis : la production de chèvres capables de produire des protéines pharmaceutiques. La technologie de base utilisée ici repose sur la culture de cellules souches embryonnaires caprines. Plusieurs des techniques employées dans nos laboratoires pourront donc être mises au service de ce projet.

a) Le projet sera mené conjointement par Nexia Biotechnologies et le Dr Lawrence C. Smith, de l'Université de Montréal (CRRA). Nexia apportera ses compétences en biologie de la reproduction chez les bovins laitiers et en biologie moléculaire et le Dr Smith, sa vaste expérience en transfert nucléaire.

b) Les technologies qui seront mises au point dans le cadre de ce projet seront transférées par Nexia à l'industrie laitière selon le processus normal. Québec jouit d'une position enviable dans le domaine de la génétique des bovins laitiers en raison de ses excellents programmes de transfert d'embryons, d'insémination artificielle et d'amélioration génétique. Il est important de noter que cette technologie est très conviviale puisqu'elle sera transférée sous forme de semence ou d'embryons par l'intermédiaire des organismes responsables : les producteurs pourront donc conserver leur structure de régie et de production actuelles tout en produisant un lait de valeur supérieure.

CONSEIL DES RECHERCHES EN PÊCHE ET EN AGRO-ALIMENTAIRE DU QUÉBEC

PROPOSITION POUR UN NOUVEAU PROJET VOLET D'APPUI À LA RECHERCHE EN PARTENARIAT

000271

4438

Aucune annexe ne sera considérée

PROGRAMME DE RECHERCHE

ENTENTE AUXILIAIRE CANADA - QUÉBEC SUR LE DÉVELOPPEMENT AGROALIMENTAIRE
DEMANDE DE SUBVENTION POUR L'ANNÉE 1996-1997

Toute demande originale doit être présentée avec une photocopie de ce document

TITRE	Embryons bovins transgéniques produits par transfert de noyaux de lignées cellulaires embryonnaires transfectées
-------	--

ORGANISMES, CHERCHEUSES ET CHERCHEURS IMPLIQUÉS (suite)

10 DESCRIPTION DES ORGANISMES PRIVÉS IMPLIQUÉS

Depuis son incorporation en 1992, Nexia s'est engagée à devenir un leader dans les techniques de recherche, de développement et de production de protéines recombinantes à partir de systèmes d'expression mammaires transgéniques chez les ruminants.

La compagnie (investissement privé; 9/93) s'est assurée d'un capital de départ de 2 500 000 \$CAN par l'intermédiaire d'un syndicat d'investissement mis sur pied par MDS Health Ventures de Toronto et la Société Innovatech de Montréal. La compagnie détient 2 brevets et en a trois en instance qui portent sur l'embryologie des ruminants et la science laitière.

Les gestionnaires de Nexia sont : Jeffrey D. Turner, Ph.D., PDG, Costas N. Karatzas, Ph.D., Directeur de la recherche et du développement et Carol L. Keefer, Ph.D., chercheure en chef en embryologie des ruminants

Voici une brève description de nos installations :

Embryologie

Un laboratoire de 1200 pi.ca. avec précautions de propreté et d'asepsie (filtre HEPA) équipée de hottes à circulation laminaire, d'incubateurs et d'un microscope Zeiss (DIC) muni d'un micromanipulateur Narishige. Le laboratoire de récolte des embryons adjacent à un local de chirurgie est équipé d'un microscope additionnel, de micromanipulateurs et d'un incubateur.

Biologie moléculaire

Un laboratoire de 2,500 pi.ca. équipé d'une ultracentrifugeuse Beckman LC5, d'un thermocycleur PCR et d'un équipement d'électrophorèse.

Ferme d'expérience

Nexia dispose de deux fermes d'expérience consacrées à la recherche sur les ruminants : la première est située à Saint-Clet au Québec, la deuxième est constituée des installations de recherche sur les bovins laitiers de l'Université McGill auxquelles nous avons accès en vertu d'un contrat de location.

Nexia a appliqué des techniques de base en biologie moléculaire, en embryologie, en culture cellulaire et en physiologie de la glande mammaire en vue d'utiliser la capacité de la glande mammaire de synthétiser des protéines chez les espèces laitières. Le fait que la compagnie détienne les brevets des méthodes de *tri in vivo* Fast-in-Milk et *in vitro* MAC-T et GMAC facilite l'évaluation du rendement de la construction génique. Ces systèmes d'intérêt biologique permettent d'évaluer rapidement la fonction et l'intégrité des constructions d'ADN ainsi que l'authenticité des produits de gènes à l'intérieur des cellules de la glande mammaire. Ainsi, notre système Fast-in-Milk fournit en moins de trente jours des informations sur le rendement des vecteurs d'expression spécifiques de la glande mammaire et sur la bioactivité/toxicité des produits de gènes dans le lait. Le groupe d'embryologie de Nexia poursuit la mise au point d'outils d'amélioration de l'efficacité de la production de ruminants transgéniques. Notre modèle embryologique comprend le BELEMD, un modèle caprin dont le temps de génération est rapide, le nombre de naissances multiples et le cycle reproducteur non saisonnier. Le transfert d'embryons de chèvres BELEMD dans des chèvres receveuses standard réduit les coûts associés aux receveuses tout en améliorant le nombre de rejetons.

Les principaux produits de Nexia sont de nouveaux aliments dérivés de produits laitiers, dont la composition et les attributs ont été modifiés à l'intention des marchés du lait nature ou transformé. Grâce à nos méthodes de production non transgéniques, des composantes indésirables du lait peuvent être éliminées et des éléments nutritifs, ajoutés ou, s'ils sont déjà présents, augmentés. La production de lait sans lactose (LHM; lactose hydrolyzed milk) est un des domaines de développement de produits les plus avancés chez Nexia. La production biologique de LHM à un faible coût permettra l'introduction de nouveaux produits dérivés du lait (produits laitiers connexes, autres catégories d'aliments) pour le consommateur.

000272

**CONSEIL DES RECHERCHES EN PÊCHE
ET EN AGRO-ALIMENTAIRE DU QUÉBEC**
**PROPOSITION POUR UN NOUVEAU PROJET
VOLET D'APPUI À LA RECHERCHE
EN PARTENARIAT**

4438

Aucune annexe ne sera considérée

**PROGRAMME DE RECHERCHE
ENTENTE AUXILIAIRE CANADA - QUÉBEC SUR LE DÉVELOPPEMENT AGROALIMENTAIRE
DEMANDE DE SUBVENTION POUR L'ANNÉE 1996-1997**

Toute demande originale doit être présentée avec une photocopie de ce document

TITRE Embryons bovins transgéniques produits par transfert de noyaux de lignées
cellulaires embryonnaires transfectées

ORGANISMES, CHERCHEUSES ET CHERCHEURS IMPLIQUÉS (suite)
11. SIGNATURES

J'atteste de mon implication à titre de requérant ou de partenaire dans le projet présenté et de la véracité des renseignements fournis à l'intérieur de la présente demande de subvention. Je certifie que les coûts des travaux de recherche décrits ne sont pas défrayés par un autre organisme.

A) DES RESPONSABLES:

Responsable scientifique du projet:

Lawrence C. Smith

Coresponsable scientifique du projet:

Carol L. Keefer

B) DU REQUÉRANT:


université

ou



organisme privé

Nom et adresse
C.R.R.A., Faculté médecine vétérinaire
Université de Montréal
3200 rue Sicotte, C.P. 5000
St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6

Réal Lallier, Ph.D.
Vice-doyen à la recherche

Signature de son représentant ou de sa représentante

Date:

Le 8 février 1996

C) DES PARTENAIRES

Nom et adresse
Jeffrey D. Turner, President & CEO
Nexia Biotechnologies, Inc.
1,000 avenue St-Charles, suite 900
Vaudreuil, QC J7V 9P5

Signature de son représentant ou de sa représentante

Signature de Jeffrey D. Turner

000273

PRÉVISIONS DE DÉPENSES

VOLET D'APPUI À LA RECHERCHE EN PARTENARIAT

Ce formulaire doit être accompagné de la description du projet ou du rapport d'étape

AVR

Demande de subvention pour l'année 1996-97

TOUTE DEMANDE ORIGINALE DOIT ÊTRE PRÉSENTÉE AVEC 1 PHOTOCOPIE COMPLÈTE

RESPONSABLE

RESPONSABLE		CORRESPONSABLE	
Nom: SMITH	Prénom: Lawrence C.	Nom:	Prénom:
TITRE DU PROJET			
Embryons bovins transgéniques produits par transfert de noyaux de lignées cellulaires embryonnaires transfectées.			
		N° DU DOSSIER (CORPAQ) 4438	

PRÉVISIONS DE DÉPENSES*

1. MEMBRES DE L'ÉQUIPE																
NOMBRE	NOMS	PERSONNE-ANNÉE	CATÉGORIE										MONTANTS PRÉVUS 1996-97	MONTANTS PRÉVUS 1997-98	MONTANTS PRÉVUS POUR LA DURÉE TOTALE DU PROJET***	SOURCE DE FINANCEMENT**
			Chercheurs	Professionnels	ÉTUDIANTS				Techniciens	De soutien	Ouvriers	Autre				
					3e cycle	2e cycle	1er cycle	Autre								
	Etudiant au doctorat	1			X								8 000	8 000	24 000	A
	Etudiant à la maîtrise	1				X							5 000	5 000	15 000	A
	Technicien	.4							X				14 000	14 000	42 000	A
	Avantages sociaux (17%)												4 590	4 590	13 770	A
	Keefer, C.L.(*)	.45	X										9 750	9 750	29 250	0
	Karatzas, C.N.(*)	.05	X										3 750	3 750	11 250	0
	Lazanis, A.(*)	.05	X										3 000	3 000	6 000	0
	Zhou, J.-F.(*)	.07	X										2 380	2 380	7 140	0
	Poulin, S. et Gagnon, I. (*)	.25							X				2 800	2 800	10 100	0
	SOUS-TOTAL (A)												31 590	31 590	94 770	A
	SOUS-TOTAL (O)												21 680	21 680	63 740	0
2. IMMOBILISATIONS (remplir la page 2 «IMMOBILISATIONS»)													\$	\$	\$	
SOUS-TOTAL (A)													10 636	---	10 636	A
SOUS-TOTAL (O)													---	---	---	0
3. FOURNITURES ET APPROVISIONNEMENTS — DESCRIPTION													\$	\$	\$	
Objectif 1. Fournitures plastiques, ADN, agents, etc.													12 000	6 000	18 000	0
Objectif 2. Milieux, sérums, anticorps, etc.													7 000	5 000	15 000	A
Objectif 3. Milieux, ovaires, anticorps, etc.													6 400	8 200	22 800	A
Objectif 4. Milieux, TE, dosage hormonal, etc.													---	6 000	11 000	0
SOUS-TOTAL (A)													13 400	13 200	37 800	A
SOUS-TOTAL (O)													12 000	12 000	29 000	0
4. AUTRES FRAIS — DESCRIPTION													\$	\$	\$	
Receveuses													---	---	18 250	0
Voyages à l'abattoir													1 500	2 000	5 500	A
Déplacements CRRA - Nexia													400	400	1 200	A
SOUS-TOTAL (A)													1 900	2 400	6 700	A
SOUS-TOTAL (O)													---	---	18 250	0
5. TOTAL DES PRÉVISIONS													\$	\$	\$	
SOUS-TOTAL (A)													57 526	47 190	149 906	A
SOUS-TOTAL (O)													33 680	33 680	110 990	0
TOTAL (A + O)													91 206	80 870	260 896	
(O / A + O) X 100****															42.54%	
REVENUS, s'il y a lieu													---	---	---	
* Ne doivent être considérés que les coûts substantiels et approuvés par le comité.																

* Ne doivent être considérés que les coûts supplémentaires occasionnés par le projet. Toutefois, les salaires équivalant à la participation du personnel régulier de l'organisme privé doivent être indiqués si ils constituent une contribution de cet organisme dans la réalisation du projet.

** Pour chaque dépenses, veuillez indiquer la source de financement: Analyse des dépenses demandée dans le cadre du processus de...

RESPONSABLE

000275

RESPONSABLE		CORESPONSABLE	
Nom: SMITH	Prénom: Lawrence C.	Nom:	Prénom:
TITRE DU PROJET			
Embryons bovins transgéniques produits par transfert de noyaux de lignées cellulaires embryonnaires transfectées.			
			N° DU DOSSIER (CORPAQ) 4438

DESCRIPTION ET JUSTIFICATION DES IMMOBILISATIONS

6. DESCRIPTION DES IMMOBILISATIONS*	
6.1 Contribution de l'organisme privé	5
SOUS-TOTAL À VENTILER AU No 2 DES PAGES PRÉCÉDENTES	
6.2 Aide financière demandée	10 636
Appareil de laboratoire : Incubateur O ₂ /CO ₂ pour la culture des embryons TN dans des milieux définis (voir soumission ci-jointe).	
SOUS-TOTAL À VENTILER AU No 2 DES PAGES PRÉCÉDENTES	

7. JUSTIFICATION DES IMMOBILISATIONS

L'achat d'un incubateur permettra la régulation des concentrations d'oxygène et la culture de tous les embryons obtenus par TN sans FCS à 5% d'O₂. Nous croyons fermement que cet appareil est essentiel pour réduire les effets exclusivement dus à la ^{culture} in vitro (anomalies observées chez les veaux issus d'embryons clonés). L'Université de Montréal n'a pas les fonds nécessaires pour l'achat de cet équipement et il n'y a pas d'incubateur de même nature à la Faculté pour la culture d'embryons. De plus, la compagnie Nexia s'est déjà engagée financièrement de plus 40% exigés pour ce projet.

SIGNATURE

J'atteste de la véracité des renseignements fournis à l'intérieur de la présente demande de subvention et certifie que les coûts des travaux de recherche décrits ne sont pas défrayés par un autre organisme.

Responsable du projet: *Lawrence C. Smith* Date: 26.4.96

Requérant: *Robert J. Smith* Date: 26.4.96

Partenaires: *Robert J. Smith* Date: April 23 1996

Robert J. Smith Date: April 23 1996

Date: _____

Date: _____

Date: _____

Date: _____

* Si le requérant ou le partenaire est une université: signature du vice-doyen, vice-doyenne à la recherche; si le requérant ou le partenaire est un organisme privé: signature du président, présidente ou son représentant sa représentante, si le partenaire est un centre de recherche gouvernemental, signature du directeur ou de la directrice du centre

NOTE: Le responsable, le requérant et tous les partenaires doivent signer ce formulaire.

Titre: Embryons bovins transgéniques produits par transfert de noyaux de lignées cellulaires embryonnaires transfectées

Hypothèse: Les lignées cellulaires embryonnaires bovines transfectées peuvent être utilisées pour obtenir, par transfert nucléaire, des embryons transgéniques viables et des veaux.

Chez le bovin, la mise au point de techniques de reproduction au cours des 40 dernières années (insémination artificielle, transfert d'embryons) a permis l'amélioration génétique rapide de plusieurs caractères, y compris le caractère laitier. De nouvelles technologies pointent à l'horizon qui recèlent un potentiel encore plus important d'amélioration génétique. Elles permettront d'augmenter la pression de sélection des contemporains et de réduire l'intervalle de génération¹. Une de ces techniques, le clonage d'embryons par transfert nucléaire (TN), a été utilisée pour produire des jumeaux et on s'attend² à ce que des améliorations substantielles du caractère laitier résultent du clonage à grande échelle. Cependant, pour que ce potentiel se réalise, les techniques doivent d'abord devenir fiables et efficaces.

Le fait de pouvoir désormais identifier des gènes, reproduire leurs séquences et introduire ces séquences dans des organismes hétérologues (transgéniques) a permis à l'industrie biotechnologique de connaître une forte croissance rapide. À titre d'exemple, on peut faire produire des protéines thérapeutiques destinées aux humains par des bactéries, des levures, des champignons ou des systèmes de culture de cellules mammaliennes. Une autre approche, soit la production d'animaux laitiers transgéniques qui sécrètent des protéines hétérologues dans leur lait, offre des avantages tant du point de vue économique que de la biotransformation. En outre, il pourrait être possible de produire des animaux laitiers transgéniques qui sécrètent de plus grandes quantités de protéines homologues du lait ou présentent une résistance à certaines maladies. Actuellement, la méthode la plus efficace pour produire des animaux transgéniques consiste en l'injection dans les pronoyaux d'une construction d'ADN dans des zygotes. Chez les animaux domestiques, cette procédure est très peu efficace : moins de 0,1% des zygotes ainsi transfectés acquièrent le caractère de transgénicité^{3,4}. Notre projet porterait donc sur la mise au point d'une technique hautement efficace pour produire des bovins ou d'autres mammifères transgéniques. La revue de littérature suivante couvre les aspects fondamentaux et appliqués des sujets les plus pertinents à ce projet.

Technologie transgénique

L'injection directe de constructions géniques dans les pronoyaux ou les noyaux de jeunes embryons est la technique la plus utilisée pour produire une progéniture transgénique chez les mammifères domestiques et les animaux de laboratoire. Cette méthode, d'abord rapportée chez la souris⁵, a été utilisée avec succès chez le porc, le mouton, la chèvre et, plus récemment, le bovin. Habituellement, 1-5% des oeufs de souris microinjectés acquièrent le caractère de transgénicité⁶. Cependant, chez le bétail, ce taux excède rarement 1%⁷. Les animaux transgéniques ainsi obtenus portent l'ADN du transgène intégré dans un de leurs chromosomes et, souvent, de multiples copies du transgène habituellement regroupées en un bloc unique. Le site chromosomique où se fait l'intégration du transgène ne semble pas spécifique, mais, dans un certain nombre de cas, cette intégration vient altérer un gène endogène : c'est la mutation d'insertion. Généralement récessives, elles sont fréquemment létales si homozygotes⁸. Un faible taux d'intégration et un patron d'expression imprévisible chez la progéniture transgénique font de l'injection intrapronucléaire une technique hautement inefficace aux résultats variables.

Une autre façon de produire des animaux transgéniques consiste à utiliser des cellules souches embryonnaires (ES) et des chimères. Les cellules ES sont prélevées chez de jeunes embryons plus particulièrement dans le bouton embryonnaire du blastocyste^{9,10}, qui peut être cultivée indéfiniment *in vitro* sous forme de lignées cellulaires indifférenciées. Lorsqu'elles sont incorporées dans un embryon hôte par injection ou aggrégation, elles contribuent au développement normal de l'animal chimérique. Les cellules ES peuvent donner naissance à tous les types de tissus chez la chimère adulte, y compris les cellules germinales¹¹. Bien que des lignées cellulaires embryonnaires aux propriétés semblables à celles des cellules ES aient été isolées chez plusieurs mammifères, y

compris le hamster¹², le rat¹³, le vison^{14,15}, le mouton^{16,17}, le porc¹⁷⁻²¹, et le bovin²²⁻²⁴, seules les cellules ES de souris se sont avérées capables de contribuer à la formation de lignées germinales.

Il est possible d'effectuer des manipulations génétiques des cellules ES *in vitro*, de sélectionner les cellules présentant une bonne intégration de la construction génique, de les propager, de les congeler dans une banque de cellules et de transmettre à des animaux les caractères associés aux constructions géniques par l'intermédiaire de chimères. Le transfert de gènes à des souris a été réalisé de cette façon²⁵. Le principal avantage de cette technique est de permettre la modification directe des gènes endogènes appelée ciblage de gènes²⁶. Si l'ADN ainsi introduit renferme des séquences homologues aux séquences endogènes, il peut y avoir recombinaison entre l'ADN exogène et endogène. L'intégration par recombinaison homologue est beaucoup moins fréquente que l'intégration au hasard. C'est pourquoi, on utilise habituellement une combinaison de techniques de sélection, d'enrichissement et de criblage pour isoler les clones de cellules ES porteuses du gène cible. Il existe plusieurs exemples de ciblage de gènes dans les cellules ES puis de transmission des lignées germinales par l'intermédiaire de chimères.

Cependant, la production d'animaux de la ferme transgéniques avec des cellules ES se heurtent à deux principaux obstacles. D'abord, bien que les cellules de type ES aient été obtenues de certaines espèces domestiques, il n'existe aucune preuve de transmission des lignées germinales à partir de chimères. Ensuite, les longs intervalles de génération rendent prohibitif le coût des études de transmission de lignées germinales chez les animaux de ferme chimériques. Cependant, le TN pourraient s'avérer plus intéressant que la production de chimères. On rapportait dans un récent numéro de *Nature*²⁷ la naissance d'agneaux normaux par TN avec comme source de noyaux des lignées cellulaires embryonnaires établies (non-ES). Comme la progéniture était issue d'un seul noyau, la contribution des lignées germinales était immédiate et assurée chez tous les rejetons. Étant donné les similarités entre le développement de l'embryon bovin et ovin, une telle approche permettrait sans doute, mais cela reste à valider, de produire des veaux normaux. On rapporte d'ailleurs la naissance de veaux à partir d'embryons TN (transfert nucléaire) issus de cellules du bouton embryonnaire («Inner cell mass», ICM) et de cellules ICM cultivées²⁸⁻³⁰. Les lignées cellulaires embryonnaire dérivées du bouton seraient donc pluripotentes. De plus, un récent article démontre que des lignées cellulaires embryonnaires pluripotentes participent au développement embryonnaire à travers l'organogenèse, ce qui débouche sur un arrêt de la gestation à 85 jours. Ce serait en partie imputable à un développement placentaire déficient²⁴, résultat, peut-être, d'une reprogrammation nucléaire incomplète.

Technologie transfert nucléaire

Le TN chez les mammifères a d'abord été mis au point chez la souris³¹ puis utilisé avec succès pour produire des rejetons vivant chez le mouton^{27,32,33}, le bovin^{28,34-37} et plusieurs autres espèces domestiques et de laboratoire. En résumé, le clonage embryonnaire par TN est obtenu par la fusion de cellules du donneur à un oocyte ou un blastomère desquels le matériel génétique a été éliminé. En général, les cellules donneuses de noyaux sont des blastomères issus d'embryons entre le stade morula et jeune blastocyste. Les oocytes hôtes sont énucléés- on en retire les chromosomes en deuxième métaphase par aspiration de la portion cytoplasmique adjacente au corps polaire. L'énucléation est ensuite confirmée à l'aide de fluorochromes spécifiques de l'ADN. La fusion entre le matériel génétique et le cytoplasme des cellules hôtes se fait par électrofusion c'est-à-dire par exposition à une impulsion électrique. L'activation de l'oocyte énucléé peut survenir pendant l'impulsion électrique ou, tel que démontré dans plusieurs articles, avant si on a recours à des agents d'activation ou au vieillissement et/ou au refroidissement des oocytes. Après la reconstruction de l'oocyte, on passe à la culture *in vitro* afin d'évaluer sa capacité à se développer jusqu'au stade de blastocystes.

Le stade du cycle cellulaire et le degré de synchronisme entre le noyau et le cytoplasme hôte au moment de la fusion³⁸⁻⁴¹ a un impact notable sur le développement des embryons bovins TN, impact qui peut se traduire par un dommage chromosomique et/ou de l'aneuploïdie en raison d'une mauvaise régulation de la réplication de l'ADN pendant le premier cycle cellulaire. Lorsqu'on utilise des blastomères embryonnaires comme donneurs de noyaux, on ne connaît pas le stade exact du cycle cellulaire. Dans ce cas, il est préférable de fusionner les blastomères à

un oocyte activé ou vieilli, dont le faible niveau de facteur de maturation (MPF) permettra de conserver l'enveloppe nucléaire originale et d'éviter la duplication de la phase S dans les noyaux du donneur⁴²⁻⁴⁴. Cependant, le développement normal d'un embryon TN repose sur la reprogrammation de l'expression génique puisque cet embryon doit entreprendre son développement au même point qu'un zygote récemment fécondé. Or, des auteurs ont suggéré que la rupture de la membrane nucléaire et la condensation prématurée des chromosomes (PCC) étaient essentielles à cette reprogrammation. En outre, la pulvérisation des chromosomes est souvent associée à la PCC possiblement en raison d'une condensation rapide de l'ADN devenu linéaire en phase S. Cependant, bien que, chez la souris, la PCC ait été reliée à une baisse du développement jusqu'au stade de blastocyste, seuls les groupes reconstitués PCC ont présenté un développement à terme. La PCC pourrait donc permettre une meilleure reprogrammation des noyaux du donneur⁴⁵. Par conséquent, il est possible que l'exposition des noyaux embryonnaires aux facteurs cytoplasmiques pendant la PCC induise une meilleure reprogrammation de la chromatine.

Si on les compare à ceux des blastomères, il est évident que les noyaux des lignées cellulaires embryonnaires sont moins en mesure de soutenir un développement normal *in vitro*. Cependant, des problèmes de développement sont également associés au TN avec blastomères : faible production de blastocystes et anomalies - habituellement une taille anormalement forte - chez les veaux clonés^{37,46,47}. On retrouve également ces gros veaux chez les sujets issus de fécondation *in vitro* (FIV) bien que plus rarement. Doit-on l'imputer au TN et à la FIV, qui font pourtant appel à des techniques différentes, ou plutôt aux conditions de culture, qui comme les techniques de clonage altèrent les cycles cellulaires de l'embryon en développement *in vitro* ? L'altération du cycle cellulaire pourrait affecter la transcription et l'expression génique normales. De récents travaux sur des noyaux de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) exposés à un ooplasme de grenouille à différents temps de la phase G1 du cycle cellulaire⁴⁸, semblent appuyer l'hypothèse de l'importance des différents événements du cycle cellulaire dans la commande transcriptionnelle. La synchronisation des cellules du donneur et du cytoplasme hôte pendant le TN serait donc cruciale pour le succès des premières étapes de la transcription chez le jeune embryon et donc pour le développement normal. Une reprogrammation déficiente de la chromatine du donneur causerait également un patron de développement anormal après TN. Bien que des facteurs ooplasmiques semblent jouer un rôle de premier plan dans la reprogrammation nucléaire, il est probable que les noyaux dédifférenciés sont plus aptes à opérer une reprogrammation complète de leur chromatine après la fusion à des oocytes énucléés. Les lignées cellulaires en différenciation sautent habituellement les phases normales G1, S, G2 et M et deviennent (G0) inactifs avant de se différencier ou de subir une apoptose. Une fois les cellules en G0, la transcription stoppe et la plupart des transcrits présents dans le cytoplasme se dégradent. La privation de sérum et de certains acides aminés essentiels amène les cellules au stade G0⁴⁹⁻⁵¹. Il faudra d'autres travaux sur l'effet du cycle cellulaire du donneur et de l'hôte afin de déterminer la cause de notre incapacité à obtenir des rejetons vivants chez le bovin après transfert des noyaux de lignées cellulaires embryonnaires. Il faudra en arriver à des protocoles efficaces de synchronisation du cycle cellulaire.

Synchronisation du cycle cellulaire

La synchronisation des blastomères bovins, quoique malaisée, peut être en partie réalisée avec des méthodes chimiques ou physiques comme l'exposition des agents de blocage du cycle cellulaire. Ainsi, cette dernière méthode a également été utilisée pour synchroniser des cellules hôtes et de donneur préalablement à la fusion⁵²⁻⁵⁸. Dans le cas des lignées cellulaires, des méthodes physiques et chimiques de synchronisation du cycle cellulaire ont été utilisées avec succès chez des lignées cellulaires somatiques de diverses origines, dont les plus communes sont : les basses températures, la sélection mitotique («shake off») la centrifugation avec Ficoll et la centrifugation d'élutriation des cellules⁵⁹⁻⁶³, qui permet de récupérer 97% ou plus des cellules en G1⁵⁹. Les cellules de carcinome, proches parentes des cellules ES, peuvent être synchronisées avec succès par sélection mitotique⁶². Les méthodes de synchronisation chimiques comprennent l'utilisation de l'aphidicoline, de l'hydroxyurea, de la lovastatine, de la mimosine et de la colchicine^{60,64-67}. La privation de sérum et d'isoleucine est également une méthode habituelle de synchronisation de plusieurs types de cellules somatiques⁴⁹⁻⁵¹. En outre, cette méthode

a été utilisée récemment chez le mouton afin de synchroniser des lignées cellulaires issues d'un embryon présentant la capacité de soutenir le développement à terme d'agneaux après TN²⁷. Les méthodes ci-dessus ont été employées seules et en combinaison pour obtenir des populations de cellules synchronisées à tous les stades possibles du cycle cellulaire. Ces protocoles doivent maintenant être testés chez des lignées cellulaires embryonnaires bovines établies en vue d'une utilisation future pour les transferts nucléaires.

LE PROJET

a) Méthode expérimentale

Objectif 1 - Établir et transfecter des lignées cellulaires embryonnaires et caractériser les patrons d'expression
Des méthodes similaires aux procédures déjà publiées pour l'établissement de cellules ES et de cellules présumément ES chez le bovin ont été utilisées pour établir plusieurs lignées cellulaires embryonnaires bovines et caprines dans les laboratoires de la compagnie Nexia Biotechnologies Inc. (NBI). La transfection de cellules bovines MAC-T, une lignée épithéliale mammaire immortelle, est effectuée de routine chez NBI. Des techniques similaires seront utilisées pour la transfection de lignées cellulaires embryonnaires.

Établissement et culture de lignées embryonnaires : Les lignées cellulaires embryonnaires seront établies à partir d'embryons fécondés *in vitro* obtenus à l'aide de techniques établies²⁸. Le bouton embryonnaire (ICM) du blastocyste sera isolé à l'aide d'enzymes ou par immunochirurgie. Des cellules du bouton seront placées sur une couche nourricière de cellules STO bloquées par la mitomycine C. Le milieu de culture (MEM + acides aminés non essentiels + β -mercaptoéthanol + sérum bovin foetal) sera remplacé aux 2 à 3 jours. Les cellules embryonnaires seront propagées mécaniquement et par voie enzymatique (trypsine) au besoin, habituellement aux 7 à 10 jours. Certaines fractions des premiers passages seront congelées de façon à pouvoir rétablir les lignées cellulaires, si nécessaire.

Caractérisation des lignées embryonnaires : Les cellules embryonnaires qui seront testées par coloration avec des anticorps seront cultivées sur des couvercles de verre préalablement ensemencés avec des couches nourricières puis fixées à l'aide d'un fixatif approprié. Les préparations fixées et lavées seront soumises aux colorations qui conviennent à l'anticorps à tester. Ces derniers seront dirigés, entre autres, contre des marqueurs de différenciation (vimentine, cytokératine) et un marqueur des cellules ES murines (SSEA1). L'activité de la phosphatase alcaline sera également déterminée. Bien que cette activité ait été utilisée comme indicative de la présence de cellules indifférenciées (cellules présumément ES) chez la souris, le porc, le mouton et la chèvre, des lignées cellulaires bovines établies donnaient un résultat négatif. Des lignées cellulaires embryonnaires seront aussi caryotypées afin de déterminer si l'incidence d'aneuploïdie et de polyploïdie augmente avec la culture et s'il existe une différence dans la stabilité des lignées mâles et femelles. Seules les lignées cellulaires avec caryotype normal seront utilisées pour la transfection et les études subséquentes sur le cycle cellulaire et le TN.

Transfection des lignées embryonnaires : Les lignées cellulaires embryonnaires avec caryotype normal seront transfectées à l'aide, entre autres, de la lipofection employée de routine chez Nexia. La construction d'ADN, qui servira à la transfection renfermera un promoteur comme le SV-40, le CMV ou la méthallothionine, un gène rapporteur comme le lacZ avec signal de localisation nucléaire (fourni par le Dr R.D. Palmiter) et un gène de résistance à la néomycine ou à l'hygromycine, ce qui permettra de sélectionner les cellules transfectées en culture. Le gène rapporteur permettra de déterminer subséquemment la persistance du transgène avant et après la synchronisation du cycle cellulaire et le TN.

Résultats attendus : Des lignées cellulaires embryonnaires bovines et caprines ont été établies et maintenues en culture pendant plus de six mois. Cependant, le degré de différenciation de la lignée bovine ou sa capacité à contribuer au développement du fœtus ou de l'embryon en préimplantation dans le cadre de TN n'ont pas été évalués. L'établissement de plusieurs lignées bovines à caryotype normal ne devrait pas poser de problèmes, tout comme la production de constructions géniques et la transfection effectuées de routine chez Nexia Biotechnologies. Les lignées

cellulaires nourricières résistantes à la néomycine et à l'hygromycine serviront à prévenir la différenciation des lignées embryonnaires et la perte des lignées transfectées pendant la sélection. Comme plusieurs lignées seront soumises à la transfection et à la sélection, nous devrions obtenir au moins une lignée cellulaire embryonnaire transfectée à caryotype normal.

Objectif 2 - Mise au point des protocoles de synchronisation du cycle cellulaire

Les méthodes de synchronisation des blastomères issus d'embryons bovins et murins à différents stades de développement ont été largement étudiées dans nos laboratoires du CRR⁵⁵⁻⁵⁸. Ces protocoles de synchronisation des lignées cellulaires somatiques ainsi que d'autres seront testées chez des lignées cellulaires embryonnaires afin d'obtenir des donneurs de noyaux viables à des stades spécifiques du cycle cellulaire.

Des lignées cellulaires embryonnaires établies à caryotype normal seront trypsinisées et soumises à des passages sur des plats de Pétri renfermant ou pas des fibroblastes inactivés à la mitomycine. Une fois l'adhérence obtenue et la croissance exponentielle déclenchée (milieu standard D-MEM + additifs + 10-20% sérum de veau foetal (FCS), nous procéderons aux traitements de synchronisation suivants :

Synchronisation du cycle cellulaire au stade G0 : Le milieu de culture habituel sera remplacé par un milieu renfermant de faibles concentrations de FCS de 0,05 à 0,5% afin de trouver quel degré de privation de sérum génère la meilleure synchronisation chez chacune des lignées cellulaires embryonnaires établies. Les effets de la privation d'isoléucine sur la synchronisation des cellules en G0 seront également évalués. Les cultures cellulaires seront examinées quotidiennement pendant une semaine afin de déterminer le temps requis pour atteindre un taux de synchronisation optimal en G0. Les différentes lignées cellulaires embryonnaires devraient normalement requérir différentes périodes d'exposition pour arriver à un blocage optimal en phase G0. La cytométrie («flow cytometry») servira à évaluer le contenu en ARN et la synthèse protéinique sera déterminée à l'aide de précurseurs radiomarqués. Une fois la synchronisation optimale obtenue, les acides aminés et le FCS supplémentaires seront ajoutés aux milieux de culture et les cellules, évaluées au regard de leur capacité à redéclencher la croissance et à former des colonies. Le caryotypage permettra de s'assurer que le protocole de synchronisation n'a pas conduit à des anomalies de ploïdie.

Synchronisation en phase G1 du cycle cellulaire : Plusieurs techniques de synchronisation en G1 seront testées afin de trouver la plus efficace et la moins dommageable. Les critères d'innocuité retenus sont un caryotype normal et la capacité subséquente à établir des colonies en croissance. Les cellules dérivées du protocole G0 décrit ci-dessus seront d'abord récoltées à des moments précis après l'ajout de sérum ou d'isoléucine au milieu de culture. Puis les températures d'incubation passeront de 37° C à 30° C afin de stopper la croissance exponentielle et de bloquer les lignées cellulaires embryonnaires en G1 comme avec les fibroblastes humains. La lovastatine, un inhibiteur de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A, sera évaluée au regard de sa capacité à synchroniser les cellules embryonnaires bovines en G1, tel qu'observé chez plusieurs lignées cellulaires mammaliennes⁶⁵. Nous évaluerons la centrifugation dans un gradient Ficoll⁶⁶ et/ou la centrifugation d'élutriation⁵⁹, qui ont toutes deux permis de produire des fractions cellulaires en G1 hautement purifiées, comme moyen physique de séparer les cellules en G1 dans des cultures cellulaires non bloquées. Des cellules en G1 non soumises à la synchronisation seront également obtenues par sélection mitotique («shake-off») tel que démontré dans les lignées cellulaires de carcinome embryonnaire⁶². Les cellules des groupes de traitement décrits ci-dessus seront évaluées afin de s'assurer que la synchronisation en phase G1 a été atteinte.

Synchronisation en phase S du cycle cellulaire : La synchronisation en phase S des lignées cellulaires embryonnaires sera obtenue par des techniques physiques et chimiques. Des cellules en phase G0 et/ou G1 récoltées grâce aux techniques de privation de sérum ou de centrifugation décrites ci-dessus seront exposées à l'aphidicoline^{51,64,69}, à la mimosine^{66,67}, ou à l'hydroxyurée^{49,51,60}. Tous ces agents agissent de façon différente pour bloquer les cellules au moment de la transition entre la phase G1 et S. Les cellules à différents stades de la phase S seront obtenues à différents moments après le lavage de l'agent de blocage cellulaire. Le traitement le

plus efficace et le moins dommageable sera déterminé respectivement par évaluation de la synthèse de l'ADN, synchrone et la capacité subséquente de former des colonies à caryotype normal.

Synchronisation en G2 : Les lignées cellulaires embryonnaires en G2 seront obtenues par centrifugation (Ficoll ou élutriation), ce qui permet de récupérer une fraction ^{59,68} de 70-75%, ou par l'utilisation d'agents inhibiteurs de la synthèse de l'ADN, qui stoppent le cycle à la frontière G1/S. Une fois ces agents lavés, les cellules passent de façon synchrone en phase S puis en G2, ce qui permet la manipulation des cellules à des moments précis de la G2. Une variation de cette méthode sera aussi testée : il s'agira d'ajouter du Hoechst 33342 au milieu de culture pour inhiber l'activité de la topoisomérase II de l'ADN⁷⁰. Jusqu'à 85% des fibroblastes humains se retrouvent en G2 avec ce protocole. Encore une fois, tous les traitements mentionnés ci-dessus seront évalués afin de déterminer le plus efficace, le moins toxique et le plus facilement réversible.

Synchronisation en métaphase du cycle cellulaire : La synchronisation en métaphase des lignées cellulaires embryonnaires sera obtenue par culture dans un milieu renfermant de la colchicine⁶⁶ ou du nocodazole⁶⁶. Afin d'obtenir de plus hauts taux de synchronisation, ces agents seront utilisés en combinaison avec un protocole de présynchronisation (une des méthodes décrites antérieurement). Les temps d'exposition et les doses seront déterminés de façon à minimiser les effets délétères. Les cellules bloquées en métaphase seront isolées de l'agent puis mis en culture dans un milieu exempt de cet agent afin de déterminer leur capacité à redémarrer la croissance et à établir des colonies. Le caryotypage permettra d'évaluer la normalité de la ploïdie des lignées cellulaires ainsi synchronisées.

Résultats attendus : Notre groupe travaille déjà depuis longtemps à la synchronisation des blastomères embryonnaires à l'aide d'agents de blocage à différents stades du cycle cellulaire⁵⁵⁻⁵⁸. En outre, les Drs Keefer et Smith possèdent une compétence reconnue en culture des lignées cellulaires somatiques et embryonnaires et en caractérisation de ces lignées cellulaires^{24,71}. Pour toutes ces raisons et aussi parce que nous proposons plusieurs méthodes pour chacun des stades du cycle cellulaire qui nous intéresse, nous devrions en trouver une qui satisfasse à nos normes d'efficacité, d'innocuité et de réversibilité.

Objectif 3 - Mettre au point des protocoles de transfert de noyaux provenant de cellules synchronisées

Les études sur l'importance de la synchronisation nucléocytoplasmique dans le TN à partir de blastomères ont été largement analysées par notre groupe. Notre objectif est de déterminer l'effet du stade du cycle cellulaire sur les premières interactions et sur le développement subséquent *in vitro* des oocytes reconstitués à partir de cellules synchronisées de lignées embryonnaires bovines donneuses.

Les protocoles décrits dans la section précédente seront utilisés pour obtenir des cellules donneuses qui seront fusionnées à des oocytes bovins récupérés par aspiration folliculaire (ovaires d'abattoir). Des protocoles *in vitro* de maturation, de fécondation et de culture d'oocytes d'ovaires d'abattoir ont été utilisés largement par notre groupe afin d'obtenir des oocytes bovins et des embryons pour la recherche. Des oocytes hôtes seront énucléés par microchirurgie et le TN sera effectué à l'aide de techniques similaires à celles qui sont utilisées pour la reconstitution d'oocytes à partir de blastomères embryonnaires. De légers ajustements à la technique d'isolement des cellules et au protocole de fusion pourraient être nécessaires afin d'optimiser l'efficacité des TN. Ces essais préliminaires permettront de standardiser les protocoles d'isolement de cellules donneuses, d'utiliser la phytohémagglutinine afin d'assurer un bon contact cellulaire au moment de la fusion et d'optimiser les paramètres d'électrostimulation comme le nombre, la durée et l'intensité des impulsions électriques continues (DC) et les avantages à utiliser le courant alternatif (AC) pour obtenir une apposition et un alignement adéquat des cellules du donneur et de l'hôte entre les électrodes. Une fois les paramètres méthodologiques déterminés, les investigations biologiques suivantes seront menées.

Fusion aux oocytes hôtes activés : Des oocytes mûris *in vitro* (24 à 28 h) seront activés de façon standard avec de l'éthanol, de l'ionomycine ou d'autres produits puis énucléés. Les oocytes activés/énucléés seront

fusionnés à des cellules donneuses en phase G0, G1 ou S qui auront été synchronisées à l'aide des protocoles décrits à l'objectif 2. Les oocytes reconstitués seront fixés à différents moments après la fusion afin d'étudier les premières interactions nucléocytoplasmiques. Les oocytes fixés seront colorés au Hoechst-33342 pour évaluer la morphologie de la chromatine puis immunocolorés à l'aide du PCNA et/ou du BrdU afin de déterminer le moment du déclenchement de la synthèse d'ADN et la durée de la phase S. La reprogrammation des protéines de la chromatine, qui se manifeste par la présence de l'histone H1 somatique, sera déterminée par immunohistochimie. De plus, le moment de la première division et la capacité subséquente à se développer normalement jusqu'au stade blastocyste sera déterminée par une culture *in vitro* d'au plus 8 jours. Toutes les techniques ci-dessus ont été utilisées antérieurement par notre groupe afin de caractériser les oocytes reconstitués à partir de noyaux de blastomères.

Fusion avant ou durant l'activation des oocytes hôtes : Des oocytes mûris *in vitro* (20 à 22 h) se trouvant en métaphase seront énucléés et fusionnés à des noyaux en phase G0, G1 ou M obtenus à l'aide des protocoles décrits ci-dessus (objectif 2). La fusion sera réalisée dans des solutions renfermant ou non du calcium afin de déterminer si l'activation se produit ou non simultanément avec la fusion. Les groupes fusionnés dans des milieux exempts de calcium seront activés quelques heures plus tard. Tel que décrit ci-dessus, les oocytes reconstitués seront fixés à différents moments après la fusion afin d'étudier les premières interactions nucléocytoplasmiques et les propriétés de reprogrammation des différents groupes de traitement. En outre, les oocytes reconstitués seront immunocolorés contre l'alpha-tubuline afin de déterminer si les niveaux élevés d'activité MPF dans le cytoplasme des oocytes secondaires pourraient affecter la morphologie du fuseau. Un inhibiteur des microtubules (nocodazole) pourrait être requis au moment de la fusion ou peu après afin d'inhiber la dispersion des chromosomes. Les oocytes seront également activés afin de déterminer le moment de la première division et leur capacité subséquente à se développer normalement jusqu'au stade de blastocyste.

Fusion à des oocytes hôtes immatures : Des oocytes immatures exempts de cellules du cumulus immédiatement après l'aspiration folliculaire (vésicule germinale au stade GV) seront bloqués en GV puis énucléés. Les cellules synchronisées en G2 et M seront fusionnées à des oocytes énucléés en GV afin d'étudier leur capacité de reprogrammation et de la comparer à celle des autres groupes. Le cytoplasme d'oocytes immatures s'est avéré capable de reprogrammer les noyaux de cellules intestinales amphibiennes⁷². On ne sait pas si la méiose reprendra normalement dans le noyau mitotique, mais il sera toujours possible d'utiliser des noyaux de donneurs synchronisés en pré-S (phase G0 et G1). Les interactions nucléocytoplasmiques et la capacité de reprogrammation seront étudiées puis il y aura mise en culture afin d'évaluer les compétences ontogéniques du cytoplasme immature hôte.

On croit de plus en plus que, par rapport aux embryons produits *in vivo*, les capacités ontogéniques des embryons cultivés sont altérées de plusieurs façons (e.g. production de gros rejets⁴⁶). Dans la littérature, on mentionne à plusieurs reprises que les embryons bovins et ovins présentent un meilleur développement lorsqu'ils sont cultivés à de faibles concentrations d'oxygène⁷³⁻⁷⁵, particulièrement lorsqu'ils sont cultivés en l'absence de sérum. Par conséquent, nous proposons l'achat d'un incubateur, qui permettra la régulation des concentrations d'oxygène et la culture de tous les embryons obtenus par TN sans FCS à 5% d'O₂. Nous croyons fermement que cet appareil est essentiel pour réduire les effets exclusivement dûs à la culture *in vitro* (anomalies observées chez les veaux issus d'embryons clonés).

Résultats attendus : Le principal objectif est de déterminer le stade cytoplasmique idéal pour le TN avec des donneurs à différents stades du cycle cellulaire. La technique de TN est utilisée depuis plusieurs années par les Drs Smith et Keefer. Le Dr Bordignon a prouvé qu'il possédait déjà la compétence voulue pour appliquer cette technique exigeante et c'est lui qui effectuera la plupart des microchirurgies sous stricte supervision. Toutes les procédures de microchirurgie sont déjà employées de routine par notre groupe et ne devraient donc poser aucune difficulté technique importante.

Objectif 4 - Caractériser les embryons produits par transfert de noyaux

Présence et activité du gène transfecté : Les embryons produits à l'étape 3 seront évalués au regard de leur normalité (taux de développement jusqu'au stade blastocyste, nombre de cellules des blastocystes, caryotype et viabilité des chromosomes) et de l'expression du gène rapporteur. Le critère initial de viabilité sera la capacité des embryons avec noyaux transférés à former des blastocystes puis la capacité de ces blastocystes à rétablir des lignées cellulaires embryonnaires (technique décrite à l'objectif 1). Ces dernières seront évaluées au regard de leur caryotype chromosomique et de l'expression du transgène à l'aide de la technique PCR et d'amorces spécifiques ou par coloration permettant de détecter l'activité de la lacZ.

Transfert d'embryons transgéniques dans des vaches receveuses : À la suite de l'évaluation du caryotype chromosomique et de l'expression du transgène *in vitro*, la capacité des embryons transgéniques TN à induire une gestation et à permettre sa poursuite à terme sera testée. Vingt embryons TN seront transférés dans dix receveuses (2 embryons par receveuses) à l'aide de techniques de transfert embryonnaire standards. Les gestations seront suivies par ultrason afin de déterminer le taux de gestation initial et de mortalité embryonnaire subséquent. La facilité de mise-bas, le poids à la naissance et l'état de santé général des veaux seront notés et la filiation et la présence et l'expression des transgènes, confirmées.

Résultats attendus : L'amplification par PCR est une technique standard pour identifier les animaux transgéniques. Les deux groupes de recherche ont une large expérience avec cette technique. On peut rencontrer des problèmes lorsqu'elle est utilisée avec un petit nombre de blastomères. Cependant, l'identification des embryons d'une même famille de clones devrait être suffisante pour confirmer l'intégration du transgène. On devrait pouvoir obtenir plus d'informations sur les patrons d'expression des lignées établies à partir d'embryons avec noyaux transférés. Les récentes réussites en matière de clonage de lignées cellulaires embryonnaires ovines²⁷ ainsi que les succès plus mitigés avec les lignées cellulaires embryonnaires bovines²⁴ sont encourageants. Les résultats chez le mouton indiquent que le facteur clé est la remise à niveau du cycle cellulaire. Par conséquent, nous croyons que les chances de succès du clonage des lignées cellulaires embryonnaires bovines transfectées à l'aide des techniques de synchronisation proposées- c'est-à-dire la naissance de rejetons à terme- sont très élevées.

b) Étapes à franchir

Objectif 1

- Établissement des lignées embryonnaires
- Caractérisation des lignées embryonnaires
- Transfection des lignées embryonnaires

Sep.96-fév.97

Nov.96-mai 97

Jan.97 - sep. 97

Objectif 2

- Utilisation de lignées non transfectées pour la synchronisation
- Utilisation de lignées transfectées pour la synchronisation

Sep. 96 - mai 97

Mai 97 - mai 98

Objectif 3

- TN avec des cellules de lignées embryonnaires
- Fusion à des oocytes hôtes activés
- Fusion avant et pendant l'activation d'oocytes hôtes
- Fusion à des oocytes hôtes immatures

Jan. 97 - mai 97

Mars 98 - mai 98

Mai 97 - sep. 98

Sep. 97 - déc. 98

Objectif 4

- Caractériser les embryons transfectés
- Transfert d'embryons transgéniques dans des receveuses

Sep. 97 - sep. 99

Mai 98 - sep. 99

c) Interdépendance avec d'autres projets et concertation

CRRA : Le Dr Smith travaille déjà à plusieurs projets reliés à cette demande-ci. Un de ceux-là, qui porte sur les mécanismes de synchronisation du cycle cellulaire chez la souris et les embryons bovins, y touche même de très près. Il a permis de démontrer l'effet des agents de blocage du cycle cellulaire en métaphase (nocodazole), en fin

de G2 (6-DMAP) et en S (aphidicoline). Un autre porte sur l'acquisition des capacités ontogéniques par les oocytes issus de follicules mûris, fécondés et cultivés *in vitro* jusqu'au stade de blastocyste chez le bovin (CRSNG-thématique). Une partie de ce projet est financée par le CORPAQ, soit l'augmentation de la production d'embryons bovins à haute valeur génétique par fécondation *in vitro* d'ovocytes de la mère. En outre, le Dr Smith mène des travaux sur l'établissement de lignées cellulaires embryonnaires chez la souris en vue de déterminer les patrons d'hérédité mitochondriale chez les mammifères (CRM). Enfin, il travaille à établir des lignées cellulaires embryonnaires de vison afin de déterminer les facteurs reliés à la reconnaissance maternelle de la gestation et à la diapause chez cette espèce (FCAR).

Nexia Biotechnologies Inc. : Nexia a appliqué des techniques de base en biologie moléculaire, en embryologie, en culture cellulaire et en physiologie de la glande mammaire en vue d'utiliser la capacité de la glande mammaire de synthétiser des protéines chez les espèces laitières. Le fait que la compagnie détienne les brevets des méthodes de tri *in vivo* Fast-in-Milk et *in vitro* MAC-T et GMAC facilite et accélère l'authentification et l'évaluation du rendement de la construction génique. Le groupe d'embryologie de Nexia poursuit la mise au point d'outils d'amélioration de l'efficacité de la production de ruminants transgéniques. Notre modèle embryologique comprend le BELEMD, un modèle caprin dont le temps de génération est rapide, le nombre de naissances multiples et le cycle reproducteur non saisonnier.

Références:

1. Bishop, M. D., et al. (1995). *Theriogenology* 43:61-70. 2. Lohius, M. M. (1995). *Theriogenology* 43:51-60. 3. Wall, R. J. (1996). *Theriogenology* 45:57-68. 4. Eyestone, W. H. (1994). *Reprod. Fertil. Dev.* 6:647-652. 5. Gordon, J. W. (1983). *Dev. Genet.* 4:1-20. 6. Brinster, R. L., et al. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4438-4442. 7. Pursel, V. G., et al. (1989). *Science* 244:1281-1288. 8. Jaenisch, R. (1988). *Science* 240:1468-1474. 9. Evans, M. J. (1981). *J. Reprod. Fert.* 62:625-631. 10. Martin, G. R. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7634-7638. 11. Bradley, A., et al. (1984). *Nature* 309:255-256. 12. Doetschman, T., et al. (1988). *Develop. Biol.* 127:224-227. 13. Iannaccone, P. M., et al. (1994). *Develop. Biol.* 163:288-292. 14. Sukoyan, M. A., et al. (1992). *Mol. Reprod. Devp.* 33:418-431. 15. Sukoyan, M. A., et al. (1993). *Mol. Reprod. Dev.* 36:148-158. 16. Handyside, A., et al. (1987). *Roux's Arch. Dev. Biol.* 196:185-190. 17. Notarianni, E., et al. (1991). *J. Reprod. Fert. Suppl.* 43:255-260. 18. Piedrahita, J. A., et al. (1990). *Theriogenology* 34:865-877. 19. Strojec, R. M., et al. (1990). *Theriogenology* 33:901-913. 20. Talbot, N. C., et al. (1993). *In Vitro Cell Dev Biol* 29A:543-554. 21. Wheeler, M. B. (1994). *Reprod. Fertil. Dev.* 6:563-568. 22. Salto, S., et al. (1992). *Roux's Arch. Dev. Biol.* 201:134-141. 23. Van Stekelenburg-Hamers, et al. (1995). *Mol. Reprod. Devp.* 40:444-454. 24. Stice, S. L., et al. (1996). *Biol. Reprod.* 54:100-110. 25. Gossler, A., et al. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9065-9069. 26. Capecchi, M. R. (1989). *Trends Genet.* 5:70-76. 27. Campbell, K. H. S., et al. (1996). *Nature* 380:64-66. 28. Keefer, C. L., et al. (1994). *Biol. Reprod.* 50:935-939. 29. Collas, P., Barnes, F. L. (1994). *Mol. Reprod. Devp.* 38:264-267. 30. Sims, M. M., First, N. L. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6143-6147. 31. McGrath, J., Solter, D. (1983). *J. Exp. Zool.* 118:355-362. 32. Willadsen, S. (1986). *Nature* 320:63-65. 33. Smith, L. C., Wilmut, I. (1989). *Biol. Reprod.* 40:1027-1035. 34. Stice, S. L., Keefer, C. L. (1993). *Biol. Reprod.* 48:715-719. 35. Barnes, F. L., et al. (1993). *Mol. Reprod. Dev.* 36:33-41. 36. Stice, S. L., et al. (1994). *Mol. Reprod. Devp.* 38:61-68. 37. Wilson, J. M., et al. (1995). *Anim. Reprod. Sc.* 38:73-83. 38. Smith, L. C., et al. (1988). *J. Reprod. Fert.* 84:619-624. 39. Smith, L. C. et al. (1990). *J. Reprod. Fert.* 88:655-663. 40. Smith, L. C., Wilmut, I. (1994). *J. Reprod. Fert.* 100:323-329. 41. Kono, T., et al. (1992). *J. Reprod. Fert.* 94:481-487. 42. Coverley, D., et al. (1993). *J. Cell Biol.* 122:985-992. 43. Campbell, K. H. S., et al. (1993). *Biol. Reprod.* 49:933-942. 44. Collas, P., et al. (1993). *Mol. Reprod. Dev.* 34:212-223. 45. Cheong, H. T., et al. (1994). *Mol. Reprod. Devp.* 37:138-145. 46. Walker, S. K., et al. (1996). *Theriogenology* 45:111-120. 47. Garry, F. B., et al. (1996). *Theriogenology* 45:141-152. 48. Wu, J. R., Gilbert, D. (1996). *Science* 271:1270-1272. 49. Tobey, R. A., et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5104-5108. 50. Kniss, D. A., Burry, R. W. (1988). *Brain Research* 439:281-288. 51. Tobey, R. A. et al. (1988). *Exp. Cell Res.* 179:400-416. 52. Collas, P., et al. (1992). *Biol. Reprod.* 46:501-511. 53. Collas, P., et al. (1992). *Biol. Reprod.* 46:492-500. 54. Otaegui, P. J. et al. (1994). *Mol. Reprod. Devp.* 39:147-152. 55. Samaké, S., Smith, L. C. (1995). *J. Exp. Zool.* 274:111-120. 56. Samaké, S., Smith, L. C. (1996). *Mol. Reprod. Devp.* (In Press) 57. Samaké, S., Smith, L. C. (1996). (subm.) 58. Samaké, S., Smith, L. C. (1996). (subm.) 59. Keng, P. C. et al. (1980). *Cell Biophys.* 2:191-206. 60. Grdina, D. J., et al. (1984). *Cell Tissue Res.* 17:223-236. 61. Enninga, I. C. et al. (1984). *Mut. Res.* 130:343-352. 62. Mummery, C. L. et al. (1984). *Develop. Biol.* 104:297-307. 63. Zickert, P. et al. (1993). *Exp. Cell Res.* 207:115-121. 64. Spadari, S. et al. (1985). *Arzneimittel-Forschung* 35:1108-1116. 65. Keyomarsi, K., et al. (1991). *Cancer Research* 51:3602-3609. 66. Urbani, L., et al. (1995). *Exp. Cell Res.* 219:159-168. 67. Orren, D. K., et al. (1995). *Mol. Cell Biol.* 15:3722-3730. 68. Krynicka, I. et al. (1980). *Neoplasma* 27:193-196. 69. Matherly, L. H. et al. (1989). *Anal. Biochem.* 182:338-345. 70. Downes, C. S., et al. (1990). *J. Cell Biol.* 110:1855-1859. 71. Moreau, G. M. et al. (1995). *Biol. Reprod.* 53:511-518. 72. Gurdon, J. B., (1966). *Nature* 210:1240-1241. 73. Watson, A. J. et al. (1994). *Biol. Reprod.* 50:725-733. 74. Thompson, J. G. E., et al. (1990). *J. Reprod. Fert.* 89:573-578. 75. Nagao, Y., et al. (1994). *Theriogenology* 41:681-687.

L'ÉQUIPE**a) Ses membres, rôles et répartition des tâches**

Dr Lawrence C. Smith : Membre du Centre de recherche en reproduction animale (CRRA) et professeur agrégé au Département de biomédecine vétérinaire de l'Université de Montréal, le Dr Smith travaille sur le TN chez les mammifères depuis 1985. Il sera responsable de la gestion financière du projet et des éléments expérimentaux qui seront menés au CRRA. Il participera directement à toutes les expériences décrites aux objectifs 2, 3 et 4.

Dr Carol L. Keefer : Elle agira comme chef d'équipe chez Nexia Biotechnologies Inc. Le Dr Keefer travaille dans le domaine de l'embryogenèse mammalienne depuis 1981 comme chercheure. Avant d'occuper son poste actuel, elle était membre du projet de TN bovin (clonage embryonnaire) de l'American Breeders Service. Elle a, entre autres, travaillé sur la production de veaux issus de TN de cellules provenant du bouton embryonnaire. Elle sera responsable des travaux de recherche menés à Nexia (objectifs 1 et 4).

Dr Costas Karatzas : Directeur de la recherche chez Nexia Biotechnologies Inc., le Dr Karatzas possède des compétences dans le domaine de l'expression des gènes hétérologues et de l'embryologie bovine. Avant d'occuper son poste actuel, il était chef de projet à Gene Pharming Europe. Il dirigera l'équipe de biologie moléculaire de Nexia, qui comprend le **Dr Anthoula Lazaris-Karatzas**, un biologiste moléculaire spécialisé dans l'expression du gène homologue et la culture cellulaire et le **Dr Jiang-Feng Zhou**, biologiste moléculaire spécialisé dans la typage d'ADN. Cette équipe sera responsable du design des constructions d'ADN, de la transfection et de la sélection des lignées cellulaires embryonnaires bovines (objectif 1) et participera à la caractérisation de l'intégration et de l'expression dans les embryons TN et les veaux (objectif 4).

Étudiant au doctorat : Le Dr Bordignon possède un DMV et une M.Sc. de même qu'une très bonne expérience en TN avec des blastomères comme donneurs nucléaires. Il sera directement responsable de la reconstitution des embryons à l'aide de lignées cellulaires embryonnaires transfectées (objectif 3) ainsi que de la caractérisation et du transfert des embryons (objectif 4). Il participera indirectement aux étapes décrites à l'objectif 2.

Étudiant à la maîtrise : Cet étudiant sera responsable des protocoles de synchronisation des lignées cellulaires embryonnaires transfectées (objectif 2). Il participera également au caryotypage des lignées cellulaires et des embryons produits par TN (objectif 4).

Technicienne du CRRA : Carmen Léveillé travaille dans le domaine de la production d'embryons bovins depuis plus de 15 ans au CRRA. Elle sera responsable de l'entretien des installations de culture cellulaire et de production d'embryons au CRRA et de la cueillette des ovaires à l'abattoir en vue de produire des oocytes destinés au TN.

Techniciennes de Nexia : Isabelle Gagnon, une technicienne vétérinaire et Sophie Poulin, qui a récemment terminé une maîtrise à l'Université Laval, participeront à la production d'embryons, et à l'établissement et à la caractérisation des lignées cellulaires embryonnaires bovines.

b) Leur productivité

Nom	Subventions (organisme et titre)	Montant	Année
L.C. Smith	CRM fonctionnement - Replication, segregation and transmission patterns of mammalian mitochondrial DNA	32 738	1994-95
		43 650	1995-96
		43 650	1996-97
L.C. Smith et D. Bousquet,	CORPAQ - Augmentation de la production d'embryons de vaches ayant une haute valeur génétique par fécondation <i>in vitro</i> d'ovocytes récupérés de leurs ovaires	37 492	1993-94
		46 885	1994-95
		42 400	1995-96
Price C.A. et L.C. Smith	CRSNG thématique - Exploitation of the oocyte reserve in preantral bovine follicles	83 000	1993-94
		83 000	1994-95
		83 000	1995-96
Murphy BD, Goff AK, Smith LC, Fortier M-A et Lambert RD	FCAR groupe - Interactions utéro-embryonnaires	48 000	1995-96
		48 000	1996-97
		48 000	1997-98

LES SIGNATURES

Dr Lawrence Smith

Dr Carol L Keefer

Dr Costas Karatzas

RÉPPORT D'ÉTAPE

PROJET EN DEUXIÈME RENOUVELLEMENT

1. Titre: Embryons bovins transgéniques produits par transfert de noyaux de lignées cellulaires embryonnaires transfectées

Embryonic stem (ES) cells are commonly used to produce transgenic mice (Robertson, 1987). The technique used in mice is that of chimera formation in which ES cells are injected into a host embryo. The resulting chimeric animal has cells derived from both transgenic ES cells and from the host embryo. Due to differences in the developmental biology of mice and domestic animals, chimera production with germ line contribution by ES cells has not been achieved in domestic animals. Chimeric pigs have been produced, but germ line chimeras have not been reported (Wheeler, 1994). However, lambs have been produced by nuclear transfer using embryonic and even adult-derived cell lines (Campbell *et al.* 1996; Wilmut *et al.* 1997). As offspring produced by nuclear transfer are derived from a single donor cell, then all cells, including the germ cells, will be identical genetically and the problems associated with chimeras can be avoided. Nuclear transfer and embryonic stem cells could be used to produce transgenic livestock animals much more efficiently than current pronuclear microinjection techniques. Unlike direct microinjection of DNA into pronuclear stage zygotes, embryonic cell line could be transfected in vitro using standard techniques. This may include chemical (lipids, calcium phosphate), physical (electroporation, gene gun bombardment, direct injection) or retroviral transfection. Cells could be selected for appropriate integration into the genome. In this manner, a cell line could be derived which would have a stably integrated transgene. Any offspring produced by nuclear transfer using cells from the line would be transgenic. This would represent a tremendous increase in efficiency over the low percentage (<10%) of transgenic offspring currently expected. Furthermore, with appropriate selection and screening of cell lines, most of the transgenic animals produced should also appropriately express the transgene.

Our working hypothesis is: "Les lignées cellulaires embryonnaires bovines transfectées peuvent être utilisées pour obtenir, par transfert nucléaire, des embryons transgéniques viables et des veaux." Therefore, our overall goal is to develop an efficient methodology for producing transgenic embryos and progeny in cattle by using the technique of nuclear transfer with transfected embryonic cell lines.

2. L'état d'avancement des travaux

Substantial advances have been made in all of the objectives we proposed. As a result of our advances, we expect to complete our overall objective within the proposed time frame. In order to detail our accomplishments, we will examine each of our specific objectives individually.

Objetif 1 - Établir et transfecter des lignes cellulaires embryonnaires et caractériser les patrons d'expression

(i) Establishment of bovine embryonic cell lines

Our attempts to establish bovine embryonic cell lines was met initially with many obstacles, including the determination of the right feeder layers to use and the composition of media to sustain undifferentiated growth for unlimited passages. Our current procedure is to use mytomicin arrested primary fibroblasts derived from mid gestation mouse embryos. None the less, bovine and goat ES cells have been successfully derived using both STO and primary fibroblast cells as feeders (Table 1). Primary embryonic fibroblast lines are derived from the carcasses of day 13 embryos which are cut, broken up with a hypodermic needle and cultured in DMEM plus 10% FCS with antibiotics. Clumps of cells begin to attach almost immediately and give rise to fibroblast over the next 2 to 3 days. Once the

most unsuccessful lines start showing signs of arrest in cell division and morphological differentiation after 4 to 5 passages.

Table 2 - Karyotypic analysis of bovine embryonic cell lines established from the ICMs of in vitro produced embryos and cultured for 5 passages on monolayers of mouse primary embryonic fibroblasts.

	Karyotype	sexe	2n	3n	n
Line 1	60 XX	female	90%	10%	none
Line 2	60 XY	male	94%	none	6%
Line 3	60 XX	female	70%	10%	20%
Line 4					

Freezing of the bovine embryonic stem cells is performed routinely during initial passages to enable re-establishment of the line in the case of its differentiation at a later passage or to accidental contamination. The procedure involves harvesting the ES cells in clusters, and placing in a freezing solution consisting of DMEM high glucose, 20% FCS and 10% glycerol. DMSO was not included when freezing bovine ES-like cells due to its effect on inducing differentiation after thawing. ES-like cells remain for 2 hr at 4°C at which stage they are placed in cryovials and stored for 2 hrs at -20°C. Finally, after another 24 hr at -70°C the vials are plunged into liquid nitrogen. Thawing is performed by placing the vial with frozen ES-like cells in water at 37°C until the contents of the vial have melted followed by transfer to a 60mm dish containing feeders in ES-DMEM. After 2 days, medium is changed and the cultures are continued until complete re-establishment of the line. In general, the recovery of frozen bovine ES-like lines is very slow and may take up to 3 to 4 weeks to regain normal patterns of growth. At this stage, cells must be morphologically classified and karyotyped to determine whether the freezing procedure has induced abnormalities.

(ii) *Caractérisation des lignées embryonnaires*

The bovine and goat ES-like cell lines established in our laboratories have been characterized in several ways. Initial characterization is performed by selecting lines that have a morphological appearance of ICM cells. After a few passages in vitro, the selected ES-like lines are characterized by karyotyping to ascertain a balanced chromosomal number and to determine the chromosomal sex of the line (Table 2). Our conventional method of karyotyping needed to be modified significantly to adjust to the culture and morphological characteristics of the ES lines. Our current karyotyping technique for bovine ES-like cell lines involves plating the cells in the absence of mouse primary fibroblasts using ES-DMEM conditioned in mouse fibroblasts. Cells are treated on the third day, during the log phase of growth, with 0.4 µg/ml nocodazole for 12 h at 37°C to arrest cells in mitosis. After removing the medium, cells are trypsinized, washed and placed in a hypotonic solution of 0.8% sodium citrate for 1 hr to swell the cells and nuclei. The hypotonic solution is removed and cells are fixed for 1 hr in 3:1 methanol-glacial acetic acid at 4 °C. The fixative is removed and the slides are left to dry at room temperature overnight. The following day the slides are stained with 5% Gimsa for 5 to 10 min followed by a thorough rinse in distilled water to remove excess stain and allowed to dry.

A second procedure of characterization involves the use of cellular markers, such as alkaline phosphatase, cytokeratin, vimentin, and SSEA1. These markers have been used to characterize both bovine and goat ES-like lines (Keefer et al, 1997). Although mouse ES lines are positive for alkaline phosphatase, goat ES-like lines show variable staining with a mixture of positive and negative cells whereas bovine are consistently negative. Cytokeratin is typical of epithelial cells and ES-cells are mostly negative to this marker whereas vimentin is a surface marker for fibroblasts (e.g. STO cells) and

stains weakly in some ES lines. The stage specific embryonic antigen (SSEA1), a murine for mouse ES cells, stained positive to goat ES lines and has not yet been characterized in our bovine lines.

The aim of this work was to optimize transfection efficiencies for our putative bovine and goat embryonic cell lines (BES and GES) with an ultimate goal of obtaining stable lines for use in nuclear transfer. In the first series of experiments the construct used was mMTnLacZ obtained from Dr. Palmiter. The plasmid contains the reporter gene LacZ, with a nuclear localization signal under the control of the mMT promoter. The advantage of the nuclear LacZ is that one can distinguish false positives (i.e., endogenous β -galactosidase expression in the cytoplasm) from transfected cells expressing the bacterial β -galactosidase gene. In more recent experiments we have been using the constructs CMV/eGFP gene (plasmid pGREEN LANTERN-1, Life Technologies) and human β -actin/eGFP. These constructs contain the reporter gene Green Fluorescence Protein (GFP) from *Aequorea victoria* jellyfish, which codes for a naturally fluorescent protein requiring no substrate for visualization. The GFP we are using is "humanized" (i.e., codon sequence) and mutated to contain threonine at position 65 to enhance fluorescence peaking. The advantage of using this fluorescent gene as a reporter being that it yields bright green fluorescence when living or fixed cells are illuminated with blue light and increases our sensitivity of detection. The plasmid contains the CMV immediate early enhancer/promoter upstream of the GFP gene, followed by SV40 t-intron and polyadenylation signal. An additional plasmid was generated, actin/eGFP. This plasmid was generated by restricting out the CMV promoter from the pGREEN LANTERN-1 plasmid and subcloning in the β -actin promoter (received from Dr. G. Matleshewski).

Embryonic stem and fibroblast cells were transfected as follows. Following patching of lines onto STO feeder cells in a 6-well dish and allowing the cells to form colonies for 1 week, the cells were transfected using the CaPO_4 method, following standard procedures with the exception that a 1-2 min glycerol shock was performed at the end of the incubation with CaPO_4 precipitate. Lipid-DNA complexes using Lipofectamine (Gibco/BRL) was performed as suggested by the supplier. The ratio and the amount of DNA used and is indicated below (Table 3). Lipid-DNA complexes using the DODAC/DOPE MLV's (INEX) were prepared as follows. The indicated amount of DNA was diluted with 0.2 ml of DMEM and mixed with the appropriate charge ratio of MLV's in 0.2 ml of DMEM (ie., for a charge ratio of 1:6.2 nmoles of lipid was used per μg of DNA). The mix was vortexed for 10 sec and the complexes were allowed to form for 30 min at room temperature. The volume was increased to 0.5 ml with DMEM and the lipid-DNA mixture was applied to the cells and allowed to incubate for 16 to 20 hrs at 37°C in $5\%\text{CO}_2$. The cells were then placed ES-DMEM and cultured for another 24 hrs. At the end of this period, cells were fixed and stained using conventional methods to detect β -galactosidase expressing cells.

Table 3. Transfections performed using the mMTnLacZ construct with bovine (BES) and goat (GES) embryonic stem cells.

Experiment number	Cell type	Construct	Method	Transfection		% efficiencies
				Charge ratio	Amount DNA	
1	BES	mMTnLacZ	MLV's	1	1 µg	0
				1	2 µg	0
				2	1 µg	0
				2	2 µg	<1%
2	BES	mMTnLacZ	Lipofectamine	1:3	1 µg	0
				1:5	1 µg	0

L. C. Smith - Projet #4438 - page 5/10

3	BES	mMTnLacZ	MLV's in suspension	1	1 µg	cells did not survive
4	GES	mMTnLacZ	CaPO ₄ MLV's	n.a.	2 µg 2.5 µg/well 1 µg 2 µg	" 0 0 <1%
5	GES	mMTnLacZ	MLV's	1	2 µg 4 µg	0 0
				2	2 µg 4 µg	1-2 bleu <1%

The transfections performed for generating the stable GEF lines were essentially the same as listed above using MLV's. Briefly, cells were plated at 5×10^5 cells/100mm dish. The next day they were lipofected using MLV's at a charge ratio of 2 with 9 µg of the appropriate DNA and 1 µg of the selectable plasmid (SV40/neo). The cells were cultured in DMEM with 10% FCS for the first 24 hrs after lipofection. Subsequently, they were fed every 2 days with DMEM + 10% FCS containing 500 µg/ml of G418. Resistant colonies were isolated after 4 days of selection. The remaining clones were pooled and grown in mass culture and referred to as 'pools'. Expression of GFP was confirmed by visualization of live cells using blue light.

Objectif 2 - Mise au point des protocoles de synchronisation du cycle cellulaire

Our efforts for synchronizing bovine ES-like cell lines have concentrated principally on the use of serum starvation. The procedure involves the use 0.5% FCS in ES-DMEM and cultures of lines for several days in the presence of mouse embryonic fibroblasts. After different periods of exposure to low FCS, medium with 20% is replaced to determine the ability of the ES-like lines to continue growing without differentiating. We have noticed that cells will withstand serum starvation for up to 7 days without losing their ability to re-initiate cell division and continue in an undifferentiated state. However, periods of starvation lasting for longer than 7 days tend to induce a slower recovery and many lines die. Other bovine ES-like lines starved for several days will differentiated into a fibroblast like line that stops dividing after a few passages.

(i) Mitotic indexes after serum starvation

The aim of these studies was to determine whether serum starvation would reduce the percentage of ES-like cells to be undergoing mitosis after different periods of culture at 0.5% of fetal calf serum (Table 4). These results indicate a slight decrease in mitotic activity within the first 24 h after serum starvation. However, mitotic activity remains largely constant from then on for the following 4 days of culture at low FCS levels. A parallel study using no FCS in the culture of bovine ES-like lines showed no further decrease in mitotic activity, suggesting that these cells are able to adapt to the culture conditions by doubling the length of their cell cycle.

Table 4 - Effect of serum starvation on the mitotic activity of bovine ES-like cell lines during 5 days of culture.

	Percentage nuclei in mitosis after serum starvation (0.5% FCS)					
	Control	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Line 1	3.0%	1.5%	3.5%	1.0%	2.0%	1.0%
Line 2	2.0%	2.5%	0.5%	1.0%	1.0%	none
Line 3	5.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.5%	2.0%

We have characterized the protein synthetic activity of bovine ES-like lines exposed to low serum concentration. Cells were placed in medium containing 0.5% FCS and harvested after specific periods to examine their ability to uptake and incorporate radiolabelled methionine into protein. Harvested cells were incubated for 2 hr in medium containing L-[³⁵S]-methionine (1 mCi/ml, >800 Ci mmol; Amersham, Canada). After incubation they were washed free of radiolabelled precursor and disrupted in SDS dissociation buffer. Total uptake (active and passive) of L-[³⁵S]-methionine was assessed by counting the SDS-dissociated extracts and acid precipitable incorporation was measured by TCA precipitation on paper filters. Results indicate that the uptake of methionine was significantly increased by serum starvation within the first 24 h of culture (Fig. 1). None the less, it appears that the cells are able to recover from the initial shock and return to normal levels of methionine uptake after 5 days of culture with 0.5% FCS and retain fairly constant levels for at least 10 days of serum starvation. The synthesis of new proteins did not vary significantly during the period analyzed ($P \geq 0.05$). However, a decrease in the ratio of uptake:incorporation was observed after 24 h of culture at 0.5% FCS, indicating a fall in the capability of serum starved cells to synthesize protein from an increased pool of amino acid precursors. None the less, the ratio incorporation:uptake was stabilized after 10 days of starvation, suggesting an ability of the cells to adapt to the low FCS levels in the medium.

Figure 1 consists of three bar graphs sharing a common x-axis labeled "Days after Serum Starvation" with values 0, 1, 2, 5, and 10. Error bars are present on all data points. Letters above bars indicate statistical significance groups.

- Uptake (mg/mg protein):** The y-axis ranges from 0 to 10. Bars are at approximately 1.2 (0), 6.0 (1), 4.2 (2), 1.2 (5), and 0.5 (10). Significance groups: b (0), a (1), ab (2), b (5), b (10).
- Incorporation (cpm/mg protein):** The y-axis ranges from 0.0 to 2.0. Bars are at approximately 0.65 (0), 0.85 (1), 0.75 (2), 0.15 (5), and 0.4 (10). Significance groups: a (0), a (1), a (2), b (5), a (10).
- Ratio Inc:Upt:** The y-axis ranges from 0.0 to 0.8. Bars are at approximately 0.5 (0), 0.22 (1), 0.23 (2), 0.18 (5), and 0.42 (10). Significance groups: a (0), b (1), b (2), b (5), ab (10).

Flow cytometric measurements are routinely used to ascertain the stage of the cell cycle of somatic cell lines. This procedure involves the trypsinizing the cultures in order to obtain a population of individualized cells that are stained with propidium iodide, a DNA specific stain, to quantify the amount of DNA in each cell. An important prerequisite to achieve optimal results with flow cytometry is to obtain cells in suspension, free of clumps. Bovine ES-like cells grow firmly attached in tightly compact colonies, making the disaggregation of viable cells very difficult. Therefore, an accurate measurement of DNA content to determine the precise stage of the cell cycle is not always possible. We have examined several techniques in order to enrich our samples with an adequate number of readable cells, including the use of several methods of cell separation (mechanical and enzymatic), fixation by several sorts of methods (ethanol, formalin, etc.) and different periods of exposure to RNases and DNA stain. The method that has provided the best flow cytometric readings is to trypsinize cells followed by fine pipetting and passing the cells in a 40 μ m nylon mesh. Cells are fixed in 70% ethanol in PBS and permeabilized with a Triton solution at 0.5% at 4 °C for 1 hr. Although the number of lines studied is too small to draw conclusions, results suggest that bovine ES-like cells do not respond to serum

L. C. Smith - Projet #4438 - page 7/10

starvation during the first 24 h of culture at 0.5% FCS (Table 5). During the second day of starvation, some lines remain unchanged whereas others appear to respond by shifting to more G2 cells, suggesting proliferation. Further lines need to be examined for longer periods of serum starvation to determine whether G0 synchronization can be achieved after several days of culture at low levels of FCS. Cell cycle synchronization studies have also been performed in a bovine embryonic fibroblast cell line. Due to the ease in separating fibroblast cells with trypsin, the quality of the isolated cell population is highly superior for flow cytometric studies than those obtained with ES-like lines. This bovine fibroblast cell line produced over 95% G0/G1 cells within the first 24 h of culture. Moreover, no change in the patterns of cell cycle synchronization was observed throughout a 10 day period of serum starvation.

Table 5 - Flow cytometric readings showing the percentages of bovine ES-like cells at different stages of the cell cycle after several days of culture in 0.5% FCS.

Bovine ES lines	Day 0			Day 1			Day 2		
	G1/G0	S	G2	G1/G0	S	G2	G1/G0	S	G2
Line 1	59.5%	12.1%	28.4%	56.9%	12.3	27.4	56.7%	13.1	30.2
Line 2	60.6%	12.0%	27.4	61.8%	8.9%	29.3	26.0%	18.3%	55.7%
Mean	60.5%	12.1%	27.9%	59.3%	10.6%	30.1%	41.4%	15.7%	43.0%

(iv) *Histone H1 composition in serum starved bovine ES cells*

The final aspect of serum starvation to be examined was the degree of modification in chromatin composition using immunocytochemistry for different forms of histone H1, a linker histone responsible for the solenoid shape of nuclear DNA. Histone H1 has been shown to be correlated with the transcriptional activity of chromatin in several animals, including cattle (Smith et al, 1996). Another form of histone H1, known as H1⁰, is known to appear in terminally differentiated cells and is also a candidate for the embryonic form of histone H1. Our objective in these studies was to examine the somatic histone H1 composition in nuclei of bovine ES-like cells exposed to low concentrations of FCS. Moreover, to verify whether serum starvation conditions could induce the assembly of H1⁰ onto the chromatin. Bovine ES lines were placed in medium at 0.5% FCS for a period of 10 days and samples were removed at different periods and examined by immunohistochemistry for somatic H1 and H1⁰. These studies were performed in collaboration with Dr. Hugh Clarke from the Dept. of Obstetrics and Gynecology, McGill University. Results using the antibody against somatic histone H1 showed strong staining from the beginning of the starvation period and no indication of a decrease in strength throughout a period of 10 days at 0.5% FCS. However, whereas H1⁰ was absent in nuclei of serum-starved cells during the first 5 days in culture at low FCS, by the 6th day nuclei begun showing signs of the presence H1⁰, suggesting that serum-starved cells undergo chromatin changes to their histone complement similar to those of terminally differentiated cells. These modifications to chromatin composition may be required for a proper reprogramming of differentiated donor nuclei in order to regain totipotency.

Objectif 3 - Mettre au point des protocoles de transfert de noyaux provenant de cellules synchronisées

Our main goal in this section was to fine tune the techniques for reconstructing bovine oocytes using ES-like cells as nuclear donors. One of the first problems encountered to adapt our current NT procedure for use with ES-like cells was to harvest individual ES-like donor cells without causing major trauma to the membrane which would affect fusion to recipient oocytes. Our current procedure is to use low levels of trypsin and chicken serum that enable reasonable disaggregation, followed by pipetting

with a fine bore pipette in medium with cytochalasin. Although many cells are destroyed during this procedure, enough cells can be obtained that show a viable morphological appearance.

(i) Establishment of a protocol for NT using activated oocytes

The method of transferring of nuclei to metaphase stage oocytes has been widely perfected in previous studies. However, the main factor influencing the initial nucleo-cytoplasmic interactions after fusion is the contrast in the high levels of MPF of the cytoplasm and low MPF of the interphase stage nuclear donor cell. This leads to premature chromosome condensation (PCC) of the donor chromatin and, in some instances, chromosomal pulverization. To avoid PCC, recipient oocytes can be artificially activated after enucleation and before fusion. However, many oocytes fail to respond adequately to the activation stimulus leading only to a temporary fall in MPF levels which re-gain pre-activation levels of MPF shortly after. Moreover, manipulated oocytes need to be stained with DNA specific dyes and exposed to UV light in order to ascertain whether enucleation was effective. We have devised a novel method of oocyte enucleation (Telophase enucleation) that is based on activation oocytes and waiting for the second polarbody extrusion before enucleation (Bordignon and Smith, 1997). The precise positioning of the telophase plate with the second polarbody enables a reliable enucleation without need for DNA dyes or UV irradiation, both known to affect the development of embryos. High percentages of successful enucleation were obtained using the telophase technique performed at 3 h (97%), 4 h (98%) and 5 h (92%) after activation with ethanol. Significantly lower percentages of enucleations were obtained using the metaphase technique (59%) in which close to 30% of the cytoplasm surrounding the first polarbody is removed. Studies using blastomeres from day 5 morula showed a significant improvement of the telophase technique compared to metaphase enucleation using aged and cooled secondary oocytes (Table 6).

Table 6 - In vitro development of reconstructed embryos using telophase II and aged recipient cytoplasts.

Experimental group	No. of oocytes	No. of replicates	Fusion (%)	Blastocyst (%)	No. of nuclei per blastocyst (SE)
Telophase II	215	6	129 (58.1)	49 (38.0) ^a	126.2 (10.49) ^c
Metaphase II	248	6	151 (59.7)	24 (16.0) ^b	83.7 (8.69) ^d

Different superscript within columns denote significant differences (a,b $P < 0.001$; c,d $P < 0.02$)

(ii) Nuclear transfer with bovine ES cells

With the above information we were able to initiate experiments using donor cells from our bovine ES-like line. ES cells were disaggregated as described above, placed in the perivitelline space of enucleated oocytes and exposed to an electric pulse that causes fusion between the membranes of the donor and recipient cells. The electrical parameters used had to be adjusted for the procedure for ES-cells since these are significantly more sensitive to lysis due to the electric pulse. We have been using double 100 μ sec pulses of 1.5 KVolts per cm, that is significantly more efficient than single pulses of similar intensity and length. Electrical stimulation must be performed as soon as possible after placing the nuclear donor cell in the perivitelline space to obtain better fusion results. None the less, fusion efficiency is substantially lower with ES cells than blastomeres (Table 7). We are currently trying to obtain an inactivated viral solution that has fusogenic properties with bovine cells. Phytohemagglutinin has been added to enhance the apposition between the nuclear donor cells and the enucleated ooplasts at the time of exposure to electric pulse. After fusion the embryos are cultured for 7 days in the presence of Menezes's B2 medium supplemented with 10 % fetal calf serum.

Table 7- Fusion and development of bovine reconstructed with nuclei from bovine ES-like cells exposed (starved) or not (control) to low concentrations of FCS.

	Metaphase II		Telophase II	
	Control	Starved	Control	Starved
Number	33	42	38	38
Fused	12	13	11	13
(%)	(36%)	(31%)	(30%)	(34%)
Cleaved	2	4	5	3
(%)	(17%)	(31%)	(45%)	(23%)
Blastocysts	1	1	3	2
(%)	(8%)	(8%)	(27%)	(15%)

(iii) Establishment of culture system free of serum

One of our proposed objectives was to establish defined culture conditions not requiring serum. Our other aims were to (i) verify whether low atmospheric levels of oxygen would improve the developmental competence when in the absence of serum and (ii) if bovine oviductal epithelial cells (BOEC) were necessary to obtain high yield of blastocysts. Briefly, results at 20% oxygen demonstrate that Menezo's B2 medium can be used without serum with no interference on blastocyst yield (Table 8). Moreover, TCM-199 with BSA 30 mg/ml is also an efficient culture medium to produce blastocysts (37%) when used in the absence of serum. In both the above cases the addition of BOEC is an important component to obtain optimal blastocyst yields. In contrast, cultures at 5% oxygen in the presence of BOEC yielded very few blastocysts.

Table 8- Effects of serum supplementation during culture on the production of bovine blastocysts in vitro.

Serum		20 % oxygen		5% oxygen	
		BOEC	no BOEC	BOEC	no BOEC
YES	Blastocysts	45%	21%	7%	26%
	(No. of nuclei)	(119)	(42)	(85)	(113)
NO	% Blastocyst	47%	17%	8%	28%
	(No. of nuclei)	(155)	(23)	(81)	(118)

Objectif 4 - Caractériser les embryons produits par transfert de noyaux

Although most of the experiments in this section will be undertaken during the third year of the project, several studies have already been initiated and are described below.

(i) Utilization of transfected cell lines in NT

As goat embryonic fibroblast (GEF) cells were more readily transfected, GEF lines transfected with the green fluorescent protein (GFP) were used in preliminary nuclear transfer trials. The recipient cytoplasts were enucleated in vitro matured bovine oocytes, whereas the donor cells were GEF-GFP. As shown below (Table 9), some early stage embryos that showed expression of were obtained. As a clonal line of GEF-GFP cells was used, all cells were expressing the GFP. Non fused donor cells could be readily identified as they fluoresced while the recipient cytoplast did not. GFP positive embryos produced by pronuclear microinjection frequently show mosaic expression (positive and negative cells in the same embryo) and disappearance of positive GFP expression with continued development. Ongoing studies will determine whether GFP positive embryos produced by nuclear transfer show similar GFP expression patterns.

Table 9- Development potential and characterization of bovine oocytes reconstructed with nuclei derived from a transfected goat embryonic fibroblast cell line.

Donor x recipient cells	Number of Reconstructed embryos produced	Number of 2- to 8-cell stage embryos	Number of >8-cell stage embryos	Number of embryos expressing GFP
GEF-GFP x bovine recipient cytoplasts	42	30	2	9 (21%)

3. Les commentaires finaux

These results show clearly that most of our objectives for the first part of the project have been achieved. We are now ready to transfect the bovine fibroblast cell line which will be sufficient to enable the production of transgenic bovine embryos. In the mean time, bovine embryonic fibroblasts will continue to be used in transfection studies and, as soon as a transgenic line is produced, it will be used in nuclear transplantation. Reconstructed transgenic embryos will be characterized for the presence of the transgene and transferred to synchronized recipients to obtain information on the post-implantation viability and their potential to support development to term.

Références:

- Bordignon, V. and L.C. Smith, 1997 Telophase enucleation: An improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol. Reprod. Develop.* (in press)
- Campbell, K.H.S., J. McWhir, W.A. Ritchie and I. Wilmut, 1996 Sheep cloned by nuclear transfer from cultured cell line. *Nature* 380: 64-66.
- Keefer, C.L., C.N. Karatzas, A. Lazaris-Karatzas, I. Gagnon, S. Poulin, B. Downey (1996) Isolation and maintenance of putative embryonic cells derived from Nigerian Dwarf goat embryos. *Biol. Reprod.* 54: abst. 462.
- Robertson, E.J., 1987 Embryo-derived stem cell lines, pp. 71-112 *Teratocarcinomas and embryonic Stem cells: a practical approach*, edited by E. J. Robertson. IRL Press, Oxford.
- Wheeler, M.B., 1994 Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 563-568.
- Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind and K.H.S. Campbell, 1997 Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.

4. Les signatures

Dr Lawrence Smith _____ Dr. Anthoula Lazaris _____

Dr Carol L Keefer _____ Dr Jiang-Feng Zhou _____

Dr Costas Karatzas _____

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.